

**PARIS**

FACULTE DE MEDECINE XAVIER-BICHAT

Année 1974

N°

THESE  
POUR LE  
DOCTORAT EN MEDECINE  
(Diplôme d'Etat)

*Présentée et soutenue publiquement le*

1974

PAR

**Marie-Lucienne TANNIERES**

Interne des hôpitaux de Paris

Née le 22 Avril 1947, à SETE (Hérault)

**ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES  
ET DES GAZ ANESTHESIQUES  
SUR LA MOBILITE DES  
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES**

*Président : M. G. VOURC'H*

LIBRAIRIE ARNETTE  
2, rue Casimir-Delavigne  
PARIS-6°

1974







THESE  
POUR LE  
DOCTORAT EN MEDECINE  
(Diplôme d'Etat)

*Présentée et soutenue publiquement le*

1974

PAR

**Marie-Lucienne TANNIERES**

Interne des hôpitaux de Paris

Née le 22 Avril 1947, à SETE (Hérault)

---

**ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES  
ET DES GAZ ANESTHESIQUES  
SUR LA MOBILITE DES  
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES**

---

*Président : M. G. VOURC'H*



LIBRAIRIE ARNETTE

2, rue Casimir-Delavigne

PARIS-6°

---

1974

THÈSE

POUR LE

DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme 2714)

1974

UNIVERSITÉ DE LYON - DÉPARTEMENT DE

CHIRURGIE

MARIE-LEONNE TANNIERS

INTÉRIEUR DES FAMILLES DE 1974

1974 (2 Avril 1974) - 1072 (1974)

ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES  
ET DES GAS ANESTHÉSISQUES  
SUR LA MOBILITÉ DES  
POLYNUCLEAIRES NEUTROPHILES



ISBN - 2-7184-0139-7

A MES PARENTS

A MES AMIS



A MONSIEUR LE PROFESSEUR VOURCH

Qui a accepté la présidence de cette  
thèse.

EN REMERCIEMENT AU PROFESSEUR NAHAS

Qui m'a permis depuis quatre ans  
de travailler au sein de son groupe de  
recherches.

EN REMERCIEMENT AU PROFESSEUR BESSIS

Qui m'a accueilli durant quatre ans  
dans son Institut de Pathologie Cellu-  
laire, et m'a permis d'acquérir des tech-  
niques d'observation cellulaire.

A L'INSERM

AU PERSONNEL DE BICÊTRE ET DE LA FACULTÉ DE MÉDECINE

EN REMERCIEMENT AUX LABORATOIRES ABBOTT

ET EN PARTICULIER AU DOCTEUR CALMEL

Qui ont largement contribué à l'impression de cette thèse.

EN REMERCIEMENT AUX LABORATOIRES ICI PHARMA

Qui ont eux aussi contribué à l'impression de cette thèse.

## PLAN

### Introduction — Définition de la mobilité leucocytaire

#### I. — DESCRIPTION DU PHÉNOMÈNE OBSERVÉ AU MICROSCOPE OPTIQUE (CONTRASTE DE PHASE). COMPARAISON EN ÉLECTRONIQUE

1. en optique
2. en électronique

#### II. — INTERPRÉTATION

- A. — Physique
- B. — Organique : certains organelles participent à la mobilité cellulaire
  1. la membrane cellulaire
  2. les centrioles
  3. les microtubules
  4. la matrice fondamentale
- C. — Enzymatique
- D. — Modèles physiques

#### III. — ORIENTATION DE LA MOBILITÉ LEUCOCYTAIRE DANS UN MILIEU PLURICELLULAIRE. DIFFÉRENCE ENTRE MOBILITÉ SPONTANÉE ET CHIMIOTACTISME

#### IV. — MOBILITÉ DES AUTRES CELLULES DE LA LIGNÉE BLANCHE IN VITRO

### Techniques d'étude de la mobilité leucocytaire des PMN

#### I. — HISTORIQUE

- A. — La méthode de Boyden ou les méthodes dérivées
- B. — Les autres méthodes sont des méthodes d'observation directe

## II. — DESCRIPTION DE LA MÉTHODE

- A. — Prélèvement des PMN humains
- B. — Séparation des PMN
  - 1. prélèvement après sédimentation spontanée
  - 2. sédimentation par gradient de sucre
  - 3. centrifugation à froid ou à chaud
- C. — Conditions d'examen. Choix du microscope
  - 1. étude au microscope à contraste de phase
  - 2. les leucocytes sont étudiés entre lame et lamelle
  - 3. le milieu d'observation
- D. — L'appareillage
- E. — Précision de la méthode : contrôle du pH et de la température
  - 1. contrôle de la température de la préparation
  - 2. mise en température de l'objectif
  - 3. contrôle de la température
  - 4. contrôle du pH de la préparation
- F. — Mise en équilibre des cellules dans une ambiance gazeuse et liquidienne constante, sans contact avec l'air ambiant
  - 1. les tonomètres d'équilibration
  - 2. la chambre d'observation

### Action des facteurs physiques

- I. — DÉFINITION D'UNE VITESSE MOYENNE ; VIABILITÉ IN VITRO ; DÉFINITION D'UNE VITESSE TÉMOIN ; DIAGRAMME DES VITESSES AU TEMPS O
  - A. — Définition d'une vitesse moyenne et témoin au temps O
  - B. — Viabilité in vitro
    - 1. sur la même cellule dans le temps
    - 2. sur des cellules sédimentant à la température du laboratoire
    - 3. sur des cellules maintenues dans un milieu plasmatique à 37° C

## II. — ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES

- A. — Influence du milieu d'observation

- B. — Action de la viscosité du milieu
- C. — Action du pH
  - 1. à 37° C
  - 2. à températures variables
  - 3. comparaison avec les résultats déjà acquis
- D. — Action de la température
  - 1. au pH physiologique
  - 2. autres résultats acquis par des méthodes différentes
  - 3. interaction pH - température
  - 4. correction du pH en fonction de la température
- E. — Notion de Q 10 : accélération de la vitesse leucocytaire par la température
  - 1. définition du Q 10
  - 2. calcul du Q 10 à pH = 7,5
  - 3. calcul du Q 10 aux autres pH
- F. — Choix de l'anticoagulant ; action du calcium

## **Action des gaz anesthésiques sur la motilité leucocytaire**

### **I. — ACTION DE DIVERSES AMBIANCES GAZEUSES**

- A. — Etude de l'action du carbogène sur la mobilité leucocytaire
- B. — Action de l'anaérobiose

### **II. — ETUDE DE L'ACTION DES GAZ ANESTHÉSQUES**

- A. — L'éther
- B. — Le chloroforme
- C. — Le protoxyde d'azote
- D. — Les anesthésiques halogénés : halothane et méthoxyflurane
  - 1. Présentation de ces deux gaz anesthésiques
  - 2. Action du méthoxyflurane in vitro sur la mobilité leucocytaire
    - à 1,5 %
    - à 1 %
    - à 0,5 %
    - au total

3. Action de l'halothane in vitro

- à 4 %
- à 3 %
- à 2 %
- sur sang complet
- en suspension plasmatique, dans une ambiance oxygénée (carbogène)
- en présence d'AMP 3'5' cyclique

4. Interprétation des résultats

5. Comparaison avec les résultats antérieures, actions diverses cellulaires

- action antibactérienne
- action sur la division cellulaire
- action sur la réponse immunitaire et la mobilité cellulaire, la phagocytose et l'anaphylaxie

6. Mécanisme d'action au niveau cellulaire des deux gaz halogénés

7. Autres facteurs influençant cette action

- oxygène
- présence d'hématies dans le milieu d'observation
- AMP 3'5' cyclique
- protoxyde d'azote

**Conclusion**

\*  
\*\*

ABRÉVIATIONS CITÉES DANS LE TEXTE :

PMN : Polymorphonucléaire neutrophile

ATP : Adénosine triphosphate

AMP 3'5' cyclique : Adénosine monophosphate 3'5' cyclique

## INTRODUCTION

### Définition de la mobilité leucocytaire

Les granulocytes sont des cellules arrondies, de 12 à 14 microns de diamètre et un noyau segmenté en plusieurs parties. Dans la circulation, ils sont sphériques et lorsqu'ils rencontrent un support, ils se déforment. In vivo, les critères de viabilité ont été décrits par Tullis, en 1956. Ce sont par ordre de sensibilité décroissante :

- le métabolisme oxydatif,
- la phagocytose,
- la motilité amœboïde,
- la résistance à des colorants imperméables,
- le mouvement Brownien,
- l'intégrité morphologique.

Ces différents critères peuvent être étudiés in vitro, plus ou moins facilement par des méthodes directes ou indirectes. Le critère choisi pour cette étude est le troisième, la mobilité amœboïde, observée directement au microscope à contraste de phase, entre lame et lamelle, dans des conditions standard.

Si dans le courant sanguin, les leucocytes sont en effet sphériques, ils se déforment lorsqu'ils rencontrent un support. Des aspects très variables peuvent être rencontrés et, entre lame et lamelle, les cellules étant modérément comprimées et adhérentes au verre, elles se déplacent à la manière d'une amibe. Elles présentent deux sortes de mouvements internes, intracytoplasmiques et externes sous forme d'expansions cytoplasmiques, de divers ordres, classés par Policard et Bessis, en 1952. Il existe ainsi :

- des expansions pseudopodiques (ce terme ayant d'ailleurs été employé pour toutes les expansions),

— des expansions en sphère, qui se voient par exemple en prémortem, ou dans certaines conditions pathologiques (bubbling),

— des expansions en voile de progression ou d'étalement sur lame,

— des expansions digitiformes,

— des expansions d'étirement.

Toutes ces expansions seront considérées pour calculer la mobilité, en dehors de :

— bubbling prémortem,

— voiles d'étalement qui empêchent toute étude de la mobilité et qui sont très rapides. D'ailleurs, une fois le voile constitué, la cellule reste sur place, sans mouvement d'expansion. Cet étalement peut être provoqué en mettant sur la lame une substance d'un pouvoir mouillant différent, telle le Formward.

Les autres expansions, traduisant la « reptation cellulaire » seront considérées, quelle que soit leur forme.

#### **I — Description du phénomène observé au microscope optique (contraste de phase) — Comparaison en électronique**

1. Comme le montre la figure 1, lorsqu'une expansion pseudopodique se forme, les bords se gélifient aussitôt, alors que le centre reste encore solide. Les granulations suivent et n'envahissent le pseudopode que secondairement (10 à 15 secondes).

2. En électronique, l'étude des leucocytes, orientée sur la morphologie de ces prolongements, a étayé les constatations de microscopie optique. Cette étude a été réalisée par Zeyserling en 1967. Il a noté l'existence de deux sortes de pseudopodes :

a) un réseau lâche de filaments, fin, contenant des vésicules ; seulement peu de granules et de mitochondries sont retrouvés. Entre le corps cellulaire contenant les granules, et la partie des pseudopodes qui bouge, il existe une barrière distinctive, fictive, qui n'est pas marquée par une structure membranaire ;

b) un prolongement incurvé, rempli de granules.



Fig. 1. — Etude au microscope à contraste de phase de la progression cytoplasmique. Deux temps :

- 1) expansion cytoplasmique de gel
- 2) invasion de granules, alors qu'une nouvelle progression s'effectue

## II — Interprétation

### A. — PHYSIQUE

La progression leucocytaire peut être considérée comme une résultante de deux forces :

a) les forces de cohésion viscoélastiques, les tensions de surface et la contractilité des systèmes fibrillaires et du cortex cellulaire tendant à maintenir la cellule dans un minimum de surface,

b) mais d'un autre côté les forces à contraction radiale, et d'inertie d'écoulement qui tendent à favoriser les expansions centrifuges.

### B. — ORGANIQUE

Certains organelles participent à la mobilité cellulaire. Ce sont :

— la membrane,

- le centriole,
- les microfibrilles et microfilaments,
- le substratum cellulaire.

Un schéma global de microscopie électronique permet de les situer (Fig 2).

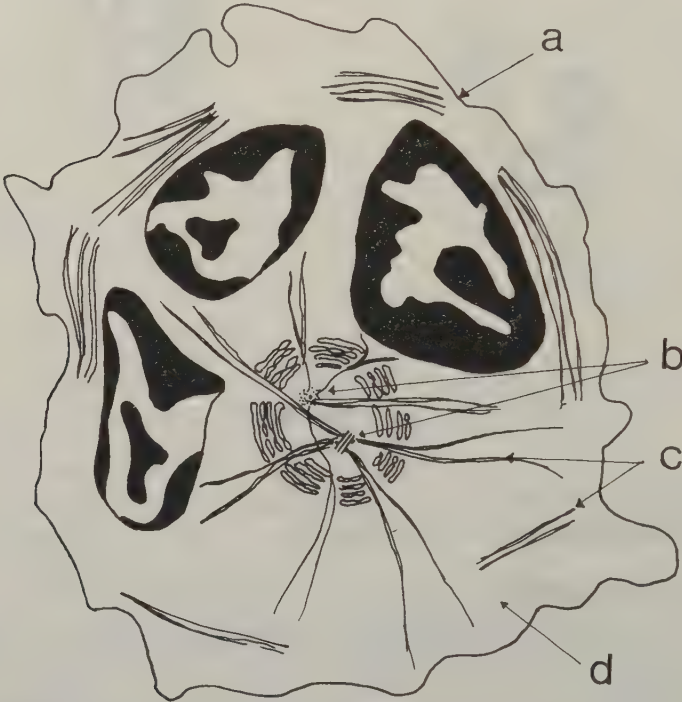


Fig. 2. — Schéma au microscope électronique d'un leucocyte :  
organelles participant à la mobilité :

- a) membrane
  - b) centrioles
  - c) microtubules et microfilaments
  - d) substance fondamentale
- d'après Bessis M. (1972)

1. *La membrane cellulaire* apparaît en trois couches au microscope électronique, de 30 Å chacune. Elle est claire au centre entourée de deux couches plus sombres, correspondant à une couche de lipides entourée de deux couches protidiques. Il existe par ailleurs des mucopolysaccharides et divers systèmes enzymatiques (confert plus loin).

2. *Les centrioles* sont au nombre de deux, placés au centre de l'appareil de Golgi, non visibles spontanément en optique en l'absence de toute coloration.

Au microscope électronique, ils apparaissent comme des petits cylindres de 3 000 à 5 000 Å de longueur. Leur paroi est formée de 9 groupes de trois tubules de 100 à 200 Å de diamètre. Ils ont été décrits entre autre par De Harven et Bernhard en 1956. Une petite hélice spiralée filamenteuse est située à l'intérieur du cylindre. Les microtubules s'attachent aux satellites du centriole, en rayon de roue et forment des couronnes péricentrilaires. Ils ont été décrits par Bessis et Breton-Gorius en 1958. Les deux centrioles sont sur un plan sagittal différent.

3. *Les microtubules* sont de 45 Å d'épaisseur. Ils sont formés de 12 à 15 protofilaments constitués de sphères de diamètre identique. Ce sont ces microfilaments qui ont été fortement incriminés dans la mobilité leucocytaire. Les relations microtubules - mobilité cellulaire ont été sources de nombreuses discussions :

— en 1968, Freed et coll. ont étudié l'effet de la colchicine au microscope électronique, en le comparant avec ses effets physiologiques ;

— en 1968, Féo et coll. ont retrouvé des résultats identiques pour la colchicine et la podophylline, qui dissolvent les microtubules, la disparition des microtubules dans les granulocytes et dans les thrombocytes humains nécessitant des concentrations 100 fois supérieures à celles employées pour les cellules en culture. Par ailleurs, il persiste le pseudopodisme et l'étalement alors que certains mouvements intracellulaires sont inhibés ;

— Allison et Nunn, en 1968, retrouvent un effet identique des anesthésiques généraux, en phase gazeuse qui à long terme dépolymérisent les microtubules, nous y reviendrons.

4. *Enfin, la matrice fondamentale* est une grande inconnue ; on ne sait pas en tout cas quelle part elle prend dans le mouvement cellulaire.

### C. — ENZYMATIQUE

De nombreux auteurs ont étudié les divers systèmes enzymatiques leucocytaires. La recherche de ces systèmes est effectuée à la suite de technique de séparation leucocytaire ou d'ultracentrifugation :

— la glycolyse aérobie et anaérobie paraît intense (Borel et coll. en 1959) :

1,8 .10<sup>-3</sup> micromole/10<sup>6</sup> leucocytes en aérobiose,  
1,82.10<sup>-3</sup> micromole/10<sup>6</sup> leucocytes en anaérobiose  
(sur 28 cas) ;

— la consommation d'oxygène face au succinate est importante :

6,62 mole 10<sup>-3</sup> O<sub>2</sub>/leuco/heure sur 28 cas ;

— le métabolisme protidique est lui aussi important. On note un pouvoir protéolytique (connu dans la phagocytose) et protéosynthétique ;

— de même, il existe diverses enzymes : des phosphatases alcalines et acides en particulier membranaires, une activité adényl - cyclase et phosphodiesterase, comme le confirme l'article de Bourne en 1971. L'activité adényl - cyclase maximale nécessite la présence de Mg<sup>++</sup>, de fortes concentrations du substrat ATP (1,2.10<sup>-3</sup> mole/litre), du NaF (1.10<sup>-2</sup> mole/litre), de protéines. En 4 heures, des quantités non négligeables d'ATP sont transformées en AMP cyclique. La théophilline inhibe l'activité phosphodiésterasique et potentialise l'effet stimulateur des prostaglandines sur l'accumulation cellulaire de l'AMP cyclique. Par ailleurs, lorsqu'on ajoute simultanément au milieu : théophilline (3.10<sup>-3</sup> mole/l), prostaglandine E1 (1.10<sup>-5</sup> mole/l), AMP 3'5' cyclique (3.10<sup>-3</sup> mole/l), il existe une inhibition de la phagocytose.

D. — CETTE MOBILITÉ LEUCOCYTAIRE EST ASSIMILÉE EN DE NOMBREUX POINTS (comme nous le verrons plus loin) A LA MOBILITÉ DE L'AMIBE.

D'ailleurs, on l'a appelé : *mouvement amœboïde* du fait de la similitude de leurs formes.

La théorie du mouvement amœboïde est double : l'explication classique et celle basée sur le système actine - myosine.

1. *L'explication classique* a été développée par Mast en 1926. Il s'agit d'un équilibre intracellulaire : sol - gel - interface (entre les deux). Deux longues théories sont actuellement épousées par certains chercheurs et en sont tirées :

— un mécanisme de contraction hydraulique dont le site le plus important est à l'arrière et qui entraîne une force de propulsion dans le filet du gel ectoplasmique ;

— un mécanisme de contraction frontale, ou de relaxation frontale, qui fait siéger la force de contraction maximale au niveau du prolongement antérieur, à la formation initiale du gel à partir du sol, et durant cette formation. Ce dernier mécanisme n'est pas capable d'expliquer à lui seul le mouvement amœboïde, mais il peut expliquer la formation de pseudopodes (Allen en 1961).

2. *L'explication par le système actine - myosine* est plus récente. Elle est basée sur des notions biochimiques, acquises au niveau des cellules musculaires.

Il est définitivement adopté qu'un ensemble : ATP, actine - myosine, situé dans le gel périphérique protoplasmique des amibes, peut être le processus biochimique, entraînant la force motrice. Il se peut aussi que la précipitation d'un nouveau gel contenant de l'actine - myosine à la partie frontale du tube existant est responsable de l'expansion du pseudopode, et peut-être de l'établissement initial de la tension et de la contraction isométrique d'un nouveau gel, mais pas des contractions isotoniques engendrant la force de propulsion. Ceci est consigné sur l'article de Bovee en 1952.

Dé toute façon, le rôle de l'ATP et de certains cations ( $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$ ) paraît essentiel. Les effets du pH et de la température seront ultérieurement rapportés.

#### E. — MODÈLES PHYSIQUES .

De nombreux modèles physiques complexes ont été élaborés. Nous ne ferons que les citer car ils dépassent le cadre de cet exposé :

Rinaldi en 1969, Keller en 1971, Lun-Hu et Barnes en 1970, Gamow en 1971.

Ainsi, le polymorphonucléaire neutrophile présente plusieurs critères de viabilité dont la mobilité. Les divers facteurs pouvant jouer un rôle dans la mobilité ont été successivement décrits, de même que les critères de viabilité *in vitro*. Le dernier facteur à étudier est l'orientation de cette motilité.

### **III — Orientation de la mobilité leucocytaire dans un milieu pluricellulaire — Différence entre mobilité spontanée et chimiotactisme**

La mobilité leucocytaire peut être spontanée, elle n'est alors visualisée qu'à des températures d'observation supérieures à la température ambiante, mais elle peut être orientée vers une substance, un organe ou une cellule : c'est le chimiotactisme.

#### **a) Une substance :**

— l'adénosine monophosphate 3'5' cyclique, qui a une activité chimiotactique, comme l'ont prouvé Leahy et coll. en 1970 ;

— la partie du complément C' en particulier C'5 (Keller en 1965).

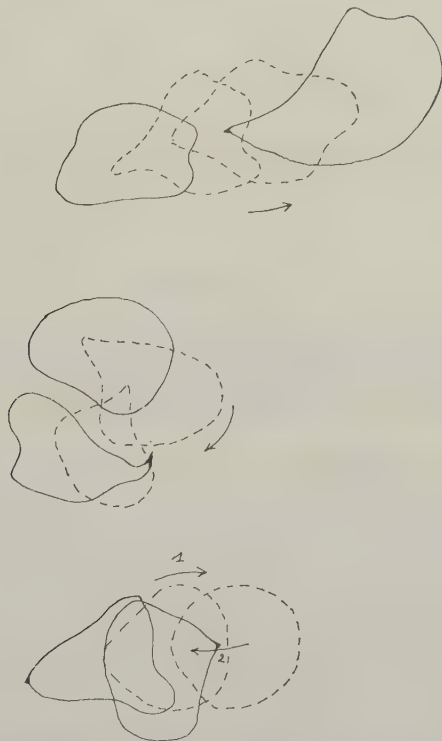
b) Une cellule telle l'hématie lorsqu'elle est morte, spontanément, par vieillissement, ou tuée par un agent quelconque : hémolyse, laser (c'est le nécrotactisme).

#### **c) Un organe, telle une bactérie, pour la phagocyter.**

La mobilité spontanée s'observe même dans le sérum physiologique, elle fait partie des propriétés intrinsèques du polynucléaire neutrophile. Elle est erratique, fragmentaire dans tous les sens, contrairement au chimiotactisme, où elle est globalement orientée. La figure 3 représente quelques exemples de mouvements spontanés d'un polynucléaire.

Il existe toutefois *in vitro*, du fait de la présence de groupes cellulaires, soit de cellules semblables (polymorphonucléaires), soit d'autres cellules sanguines, telles les hématies, les plaquettes, ou les autres cellules blanches (la séparation cellulaire pour obtenir un groupe isolé tant très difficile

dans les conditions présentes), des phénomènes de contact guidance ou de contact inhibition, entraînés par exemple par la collision de deux cellules.



*Fig. 3.* — Schéma représentant 3 exemples de mouvements cellulaires au microscope à contraste de phase

#### IV — Mobilité des autres cellules de la lignée blanche *in vitro*

Toutes les autres cellules de la lignée blanche sont mobiles: polymorphonucléaires éosinophiles, basophiles, lymphocytes, à des vitesses différentes.

Dans les chapitres suivants, seront successivement envisagés les techniques d'étude utilisées et les résultats, en comparaison avec les travaux antérieurs se rapportant au même sujet.

## PREMIERE PARTIE

### TECHNIQUES D'ETUDE DE LA MOBILITE LEUCOCYTAIRE DES PMN

#### I — Historique

Deux sortes de méthodes ont été utilisées pour mesurer la motilité leucocytaire indirecte et directe.

##### A — La méthode de Boyden ou les méthodes dérivées

Elles ont surtout été appliquées à l'étude du chimiotactisme auquel elle est mieux adaptée. Certains auteurs s'en sont servi pour mesurer la mobilité leucocytaire, sans transfert actif. En 1962, Boyden a testé l'action de diverses substances chimiotactiques, par la migration active des PMN à travers un filtre millipore.

Les PMN de lapin, obtenus par la méthode de Hirsch et Church en 1960, sont prélevés sur l'exsudat péritonéal, collecté trois heures et demie après l'introduction de 150 mg de glycogène dans la cavité péritonéale. Les cellules sont par la suite centrifugées, et rediluées dans une solution de Hanks, avec 50 millions de Pénicilline et 50 U de streptomycine, de telle façon qu'elles soient à une concentration de  $1,5 \cdot 10^6$  dans 20 % de sérum de lapin, et 80 % de solution de Hanks. Ces cellules sont introduites dans un des deux compartiments de la chambre de Boyden, en plexiglass.

Cette chambre présente en effet deux compartiments séparés l'un de l'autre par une membrane de filtre millipore, de 13 mm de diamètre, et dont le diamètre des pores est tel que les leucocytes ne peuvent passer à moins d'une migration active.

Donc, d'un côté de la membrane, les PMN, de l'autre la substance chimiotactique, à concentration variable. Après un certain temps d'incubation, la membrane millipore est fixée, puis lavée. Le nombre de cellules ayant migré activement de l'autre côté de la membrane est compté champ par champ au microscope. L'activité de diverses substances a été ainsi étudiée : tuberculine, mixture antigène-anticorps.

D'autres auteurs ont appliqué ou décrit d'autres méthodes indirectes, dérivées de la technique de Boyden :

— Keller et Sorkin en 1965 ont recherché l'agent chimiotactique thermostable.

— Peter O. Wards en 1968 a mis au point des études de cinétique leucocytaire avec chimiotactisme, et déterminé quelques agents chimiotactiques présents dans les bactéries.

— Hurley en 1963 a tenté aussi de mettre en évidence ces mêmes agents.

#### **B — Les autres méthodes sont des méthodes d'observation directes**

Commandon, le premier en 1913 suit les leucocytes au microscope à contraste de phase, et mesure leur motilité.

De nombreuses références se rapportent par la suite à la description de la méthode et l'action de nombreux facteurs, sur la mobilité spontanée et sur le chimiotactisme, chez l'homme ou l'animal :

— Bessis en 1962, 1961, 1965. Barat et coll. en 1970 l'ont appliquée au nécrotactisme et à l'action de différents facteurs physiques.

— Lapin en 1956 a utilisé une méthode intermédiaire, entre lame et lamelle, il mesure la motilité globale des PMN placés dans le centre de la préparation, qui est épaisse, en comptant le nombre de PMN se retrouvant à la périphérie de la lamelle.

Notre méthode est une méthode directe, inspirée de la technique de Commandon et de Bessis, auxquelles nous avons amené quelques modifications.

## II — Description de la méthode

La technique comporte plusieurs temps qui seront successivement décrits :

- A) Prélèvement des PMN humains ;
- B) Séparation des PMN ;
- C) Conditions nécessaires. Choix du microscope à contraste de phase ;
- D) Présentation de l'appareillage : microscope avec enregistrement magnétoscopique ;
- E) Contrôle de la température ;
- F) Système pour l'étude des PMN dans un milieu constant. Chambre d'observation.

### A — Prélèvement du sang

Le sang est prélevé chez des donneurs humains, n'ayant pas de maladies évolutives connues, de la banque du sang de Bicêtre.

Aucun critère de sexe, d'âge, de poids, de groupe n'a été demandé. 10 à 20 ml de sang sont prélevés chez chaque donneur, dans un tube propre avec anticoagulant.

La calciparine a été choisie, après des expériences tests (confert plus loin) à la dose de 25 unités par millilitre.

Le tube est incliné à 45°, pour une meilleure sédimentation, pendant 60 à 90 minutes.

### B — Séparation des polynucléaires neutrophiles

Il existe de nombreuses techniques de séparation des polynucléaires :

1. *Prélèvement de la couche leucocytaire après sédimentation spontanée.* C'est la moins traumatique. Normalement, le sang sédimente en plusieurs couches, les hématies les plus lourdes tombent en bas du tube, puis les leucocytes se mettent dans une couche intermédiaire, enfin dans la couche supé-

rieure, on retrouve le plasma, les plaquettes et les lymphocytes que l'on isole par centrifugation secondaire de la couche plasmatique. En prélevant la couche des leucocytes, à l'aide d'une pipette Pasteur, il est évident que l'on recueille aussi des hématies, des plaquettes et des lymphocytes, mais les rapports de concentration ne sont plus les mêmes.

2. *Sédimentation par gradient de sucre*, mannitol ou dextran, qui entraînent une sédimentation plus rapide, mais qui peuvent fausser au départ les résultats obtenus, pour l'étude de l'action de certains gaz sur la mobilité leucocytaire.

3. *Centrifugation à froid ou à chaud*. Elle fait gagner le temps de la sédimentation, mais la viabilité cellulaire est plus faible que lorsque les cellules sédimentent à 4° C.

La figure 4 représente les deux temps : sédimentation et prélèvement.

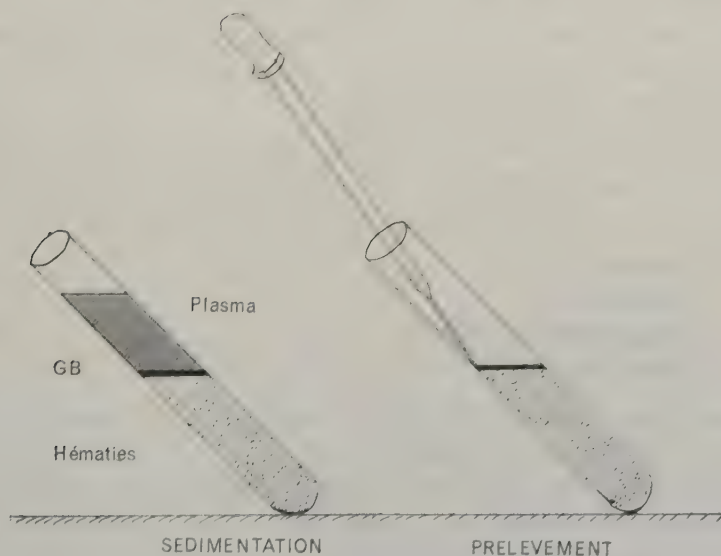


Fig. 4. — Schéma représentant la sédimentation du sang in vitro, et le prélèvement de la couche leucocytaire

## C — Conditions d'examen — Choix du microscope

1. *L'étude au microscope à contraste de phase* a été choisie car elle permet une observation fonctionnelle des cellules vivantes :

a) les leucocytes sont incolores et ne modifient pas l'amplitude des ondes lumineuses qui les traversent, sinon en les colorant (colorations vitales, en fait toxiques pour les cellules plus ou moins rapidement) ;

b) l'état vibratoire des ondes lumineuse est modifié après traversée de l'objet en différentes phases, transformées elles-mêmes en différentes amplitudes par le contraste de phase ; ainsi les cellules peuvent être étudiées, à l'état vivant, sans colorations.

2. *Les leucocytes sont étudiés entre lame et lamelle*, sous compression modérée, et les préparations sont lutées pour ne pas compromettre la viabilité cellulaire. Il existe une compression modérée, pour que les cellules adhèrent, et en même temps que le contraste soit clair. Pour l'étude des gaz anesthésiques les cellules sont placées dans une chambre d'observation, comme nous le verrons plus loin.

3. *Le milieu d'observation* joue un rôle capital. Le milieu préférentiel est le milieu physiologique : le plasma. Nous avons comparé la viabilité cellulaire de divers milieux :

- plasma,
- plasmagel,
- sérum salé isotonique,
- milieu 144.

Le plasma est le milieu qui maintient une vitesse leucocytaire maximale, en 7 heures.

4. Dans le cas d'utilisation de chambres d'observation, le microscope à contraste de phase inversé est préférable, puisqu'il permet d'avoir un meilleur contraste, pour une plus grande épaisseur de préparation.

## D — L'appareillage

Il consiste, comme le montre la figure 5, en un microscope à contraste de phase Wild, avec un objectif à immersion HI 50 pH. Ce microscope a deux oculaires, l'un permettant la visualisation directe des cellules de la préparation, et l'autre qui est relié par l'intermédiaire d'une caméra modèle FA 32 S.O.T.R.A.F.A. à un poste de télévision modèle BG 61 S.O.T.R.A.F.A. On peut ainsi suivre en même temps le mouvement cellulaire sur l'oculaire et sur l'écran de télévision. Ainsi la vitesse de reptation peut être calculée facilement, simultanément, ou plus tard, avec les bandes d'enregistrement magnétoscopique. Une correction d'échelle seule suffit.

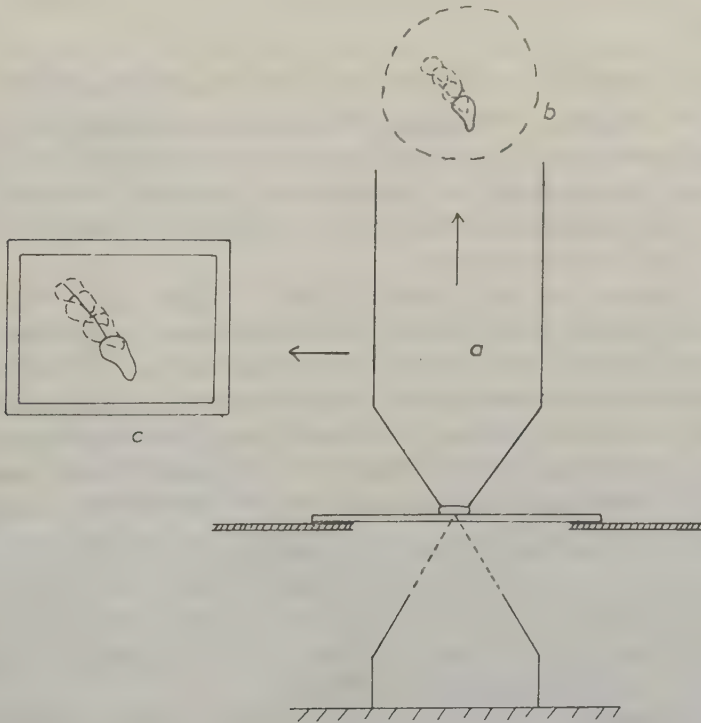


Fig. 5. — Technique d'observation directe in vitro des cellules sanguines à l'état vivant :

- a) microscope à contraste de phase, l'objectif est à immersion
- b) oculaire
- c) report par un système de caméra sur un écran de télévision et un enregistrement sous magnétoscope

Le grossissement est calculé avec comme référence une cellule de Malassez. Les cellules sont décalquées sur l'écran toutes les 15 secondes durant le maximum de temps possible, en pratique 2 à 3 minutes. Le mouvement maximum des cellules est compté, c'est-à-dire le déplacement dans tous les sens est compté en valeur absolue.

## **E — Précision de la méthode — Contrôle du pH et de la température**

Seront successivement étudiés le contrôle de la température et du pH.

### *1. Contrôle de la température de la préparation et de l'objet.*

Les méthodes précédemment utilisées étaient doubles :

— la mise en température de la préparation se faisait (Commandon en 1914) en enfermant le microscope dans une enceinte thermostatée, à température constante. C'est la plus fiable, mais elle est d'un maniement difficile et coûteux, et surtout d'une grande inertie ;

— l'autre méthode, fréquemment utilisée, est celle de la mise en température de la préparation par la platine, à la périphérie de la lame. Elle est peu fiable, du fait de la présence de gradients thermiques importants de la périphérie au centre de la lame, surtout en utilisant un objectif à immersion ;

— le système employé dans cette étude a été mis au point par J.F. Lennon en 1970 à l'Institut de Pathologie Cellulaire.

Elle permet de mettre à la température voulue la préparation par l'intermédiaire de l'objectif. Elle n'est valable que dans le cas d'un objectif à immersion, du fait du contact étroit entre l'objectif et la préparation, et les étalonnages varient suivant l'huile à immersion utilisée.

Il remarque que le contact thermique entre l'objet et la face frontale de l'objectif est excellent lorsque la distance est inférieure à 1 mm et la surface de contact supérieure à 0,5 cm. En pratique, pour un microscope à contraste de phase, les conditions sont réalisées et l'objet est à la même température que l'objectif.

## 2. Mise en température de l'objectif :

Il existe une bague isolante au-dessus de l'objectif, le séparant du corps du microscope, et un isolant sous la lame, entre la lame et la platine. Autour de l'objectif, nous avons adopté la technique de circulation d'un fluide à température donnée : serpentín de cuivre de 2 mm de diamètre intérieur, de 3 mm de diamètre extérieur, soudé sur une lame plate et enroulé en spirales.

La deuxième possibilité était de chauffer l'objectif par l'intermédiaire d'un chauffage électrique avec fils de constantan. Cette technique a une inertie plus faible, mais elle ne permet pas de porter l'objet à des températures plus basses que la température ambiante.

Par ce système, il existe toujours un gradient de température du centre à la périphérie de la préparation, mais la cellule étudiée sous microscope est toujours à la même température, et surtout à la température voulue. La mise en température est effectuée dans un temps très bref, en moins d'une minute, on prendra donc la précaution de ne commencer l'examen des leucocytes qu'après une minute d'équilibration.

## 3. Contrôle de la température :

Il s'effectue par un microthermocouple cuivre-constantan dont les extrémités sont effilées par l'acide nitrique fumant, jusqu'à ce qu'elles mesurent quelques dixièmes de millimètres de diamètre. Ce microcouple est situé soit sur la même lame, au-dessous de la lame (on peut assimiler la température sous la lame et lamelle, le gradient étant inférieur à 1/10 de degré), soit placé entre lame et lamelle, sur la même lame, où les cellules sont observées, à côté de la préparation.

En principe, en dehors des mesures d'étalonnage et des mesures d'étude de l'influence de la température sur la vitesse des PMN, le contrôle de la température sera effectué en début ou en fin d'expérience, mais la température peut être contrôlée à tout moment, durant les expériences.

Cette technique a été utilisée de  $-5^{\circ}\text{C}$  (avec des lamelles antigivrantes) à  $+50^{\circ}\text{C}$ . La précision est de 2 à 3 dixièmes de degré. Cette méthode est fiable et reproductible.

Les figures 6 et 7 représentent la mesure et le contrôle de la température par ces deux systèmes.

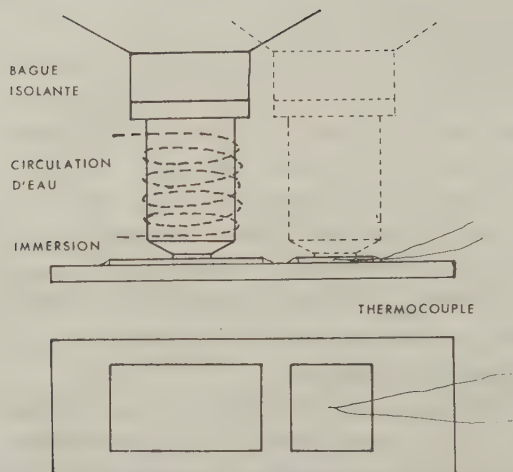


Fig. 6. — Contrôle de la température de la préparation :  
le thermocouple est placé dans une préparation de référence

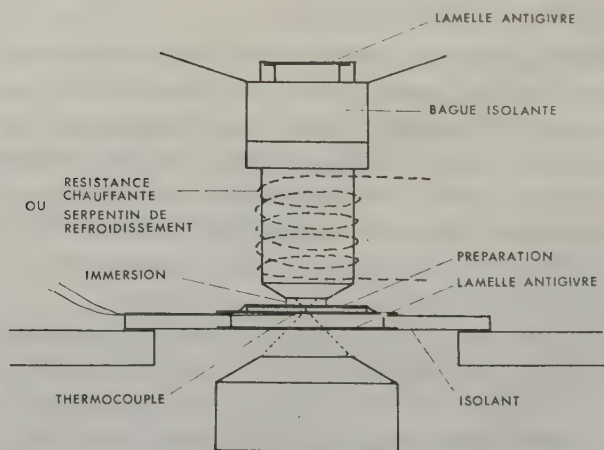


Fig. 7. — Contrôle de la température de la préparation :  
le thermocouple est placé sous la lame porte-objet

La figure 8 représente le gradient de température du centre à la périphérie de la préparation.

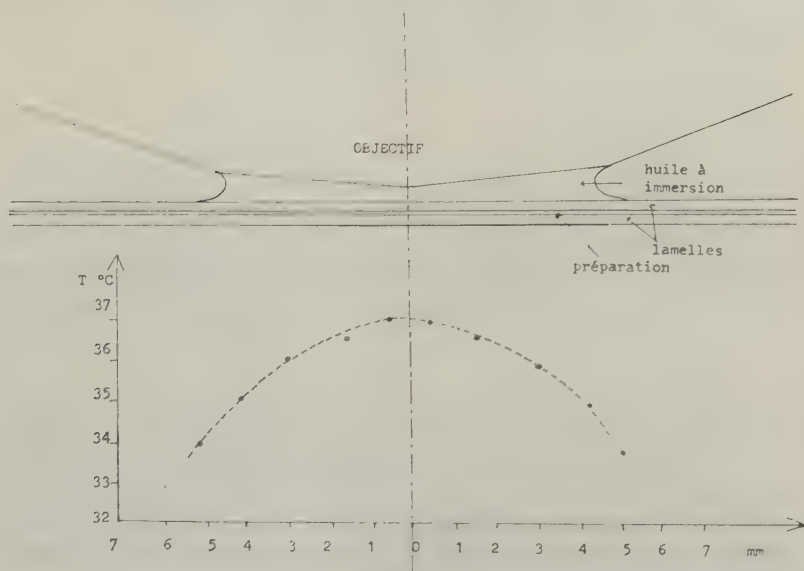


Fig. 8. — Gradient de température dans une préparation chauffée par l'objectif. La température ambiante est à 22° C et la circulation d'eau à 41° C

(les Fig. 6, 7, 8 ont été tirées de la publication de J.F. Lennon en 1970)

La source de chaleur est une pompe Roucaire avec thermostat, à circulation type FE. Une courbe a été tracée représentant la température obtenue au niveau d'un thermocouple entre lame et lamelle en fonction de la température donnée, inscrite sur le thermostat de la pompe. Bien entendu les longueurs des tuyaux reliant la pompe avec l'objectif du microscope sont un facteur de variation, et des mesures d'étalonnages doivent être refaites lorsqu'on change la longueur des tuyaux, de même d'ailleurs que leur diamètre.

Pour le refroidissement de l'objet, on utilise la même pompe, qui pulse un liquide à la température ambiante, à débit constant. Entre la pompe et l'objectif, le tuyau en caoutchouc passe dans un compartiment réfrigéré contenant de la glace ou de la neige carbonique, mélangée à de l'eau dans des proportions variables qui dépendent de la température désirée. Le liquide pulsé est de l'eau distillée.

L'obtention de températures basses est plus difficile, et les températures sont moins stables. Toutefois, des expériences durant 15 à 20 minutes ont été faites sans problèmes. La figure 9 représente le système dans son ensemble.

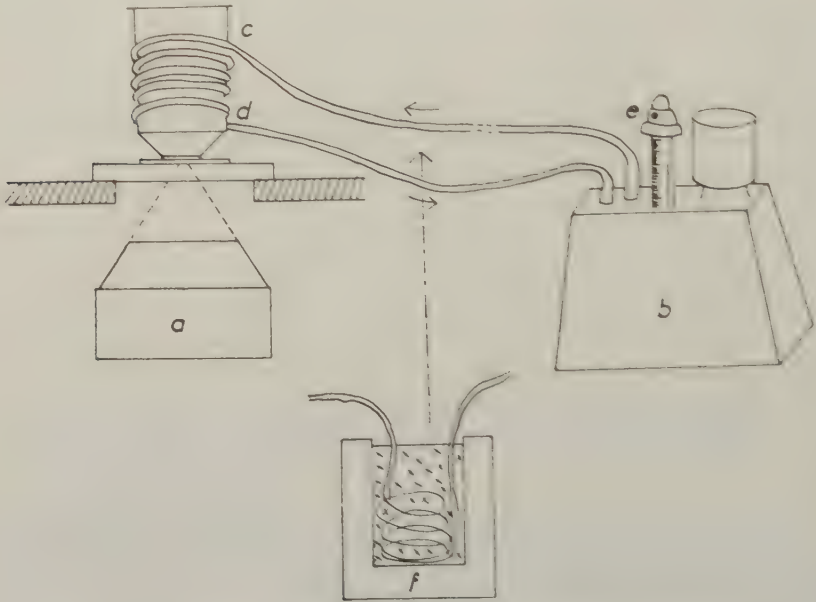


Fig. 9. — Système global de régulation de la température d'une préparation par l'objectif : a : microscope ; b : pompe Roucaire à circulation FE ; c : arrivée de l'eau chaude ; d : sortie de l'eau chaude ; e : thermomètre réglable ; f : système de réfrigération

#### 4. Contrôle du pH de la préparation :

L'obtention du pH voulu est effectuée avec de l'acide lactique pour obtenir un pH plus acide, du THAM pour les pH alcalins (Tableau I).

TABEAU I

| Acide lactique        | pH du plasma |
|-----------------------|--------------|
| 0                     | 7,52         |
| $1 \cdot 10^{-3}$ M   | 7,10         |
| $3 \cdot 10^{-3}$ M   | 6,70         |
| $4,5 \cdot 10^{-3}$ M | 6,05         |

| T.H.A.M.              | pH du plasma |
|-----------------------|--------------|
| 0                     | 7,52         |
| $0,8 \cdot 10^{-2}$ M | 7,80         |
| $1 \cdot 10^{-2}$ M   | 8,20         |

Le bicarbonate de sodium n'a pas été retenu pour alcaliniser le plasma, car il donne des pH variables du début à la fin de l'expérience. Les pH des solutions de leucocytes dans le plasma seront corrigés suivant des tables, en fonction de la température d'observation. En pratique, le pH sera contrôlé en début et en fin d'expérience.

#### F — Mise en équilibre des cellules dans une ambiance gazeuse et liquidienne constante sans contact avec l'air ambiant

Pour l'étude de l'action des drogues et surtout des gaz de composition variable sur la mobilité leucocytaire, il faut pouvoir équilibrer le plasma avec ces substances ou ces gaz dans des conditions physiques constantes, et pouvoir observer les cellules sous microscope sans qu'elles n'aient pris contact avec l'air ambiant. Ce système a été mis au point dans le laboratoire et consigné sur une note parue en 1971. La figure 10 représente le système globalement, la figure 11 la chambre d'observation. Il comporte deux parties : une série de tonomètres d'équilibration, et une cellule d'observation en communication avec ces derniers.

1. *Les tonomètre d'équilibration*, de volume de 15 ml maximum, sont immergés dans un bain thermostaté à température constante qui est de  $38^{\circ}\text{C} +$  ou  $- 0,5^{\circ}\text{C}$ . Ils sont reliés par l'intermédiaire d'humidificateurs à des bouteilles contenant des mélanges gazeux, en l'occurrence pour les expériences standard :  $\text{N}_2$  75 %,  $\text{O}_2$  19 %,  $\text{CO}_2$  5 %, mais qui peuvent être différents, et qui permettent de maintenir un microenvironnement des cellules sanguines dans des conditions déterminées. Un vaporisateur de gaz anesthésiques étalonné est incorporé au circuit et peut être mis en dérivation pour les mesures standard : ainsi le Pentrec, le Fluotec, le vaporisateur à éther.

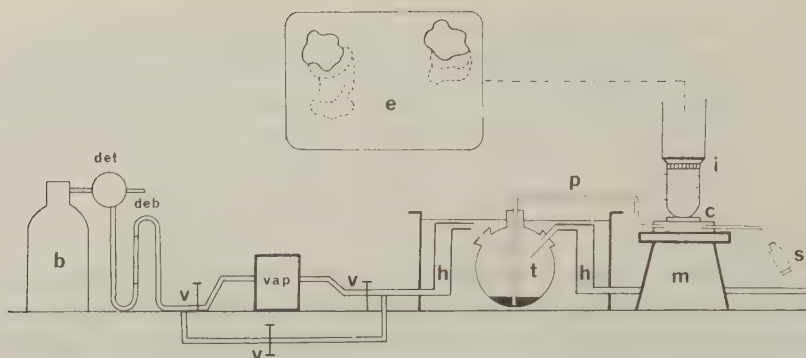


Fig. 10. — Système pour l'étude des cellules du sang sous microscope : ce système comporte : 1) une bouteille (b) contenant les gaz d'équilibration avec détendeur (deb) ; 2) un vaporisateur étalonné pour vaporiser des anesthésiques ; 3) une série de vannes (v) qui permettent de court-circuiter le vaporisateur ; 4) un bain thermostaté avec tonomètres (t) et humidificateurs (h) ; 5) une chambre d'observation (c) reliée au tonomètre par un tube en polyéthylène (p), une seringue (s) permet de remplir la chambre d'observation ; 6) un microscope à contraste de phase (m) à objectif thermostaté avec une bague isolante (i) ; 7) un écran de télévision (e) permet d'observer et de mesurer la vitesse de reptation leucocytaire

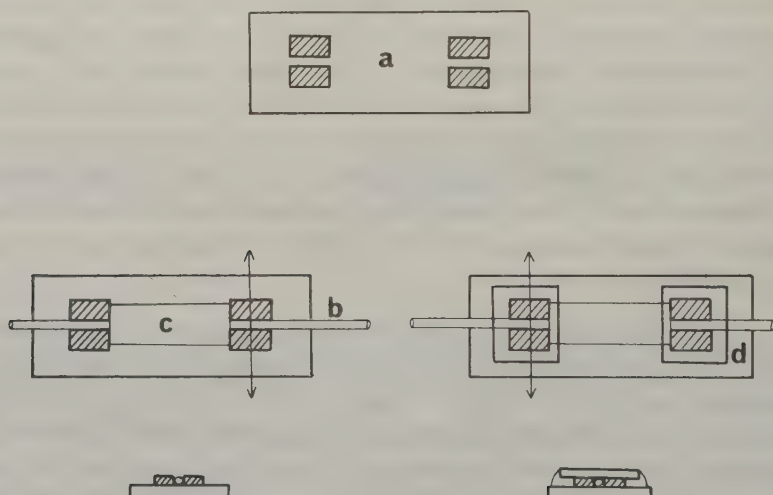


Fig. 11. — Chambre d'observation permettant un prélèvement des cellules du sang sans les exposer à l'air : cette chambre est faite d'une lame sur laquelle on colle quatre fragments de lame (a), on insère ensuite deux tubes de polyéthylène entre les fragments de lame (b), on place ensuite la lamelle dans l'espace compris entre chaque paire de fragments de lame (c). On recouvre l'ensemble avec deux fragments de lame que l'on cimente avec de la colle 3 M EC 1236

2. *La chambre d'observation* est décrite sur la figure 11. Elle est constituée d'une lame (a) et d'une lamelle (c) avec de la résine (3 M E C 1236) et reliée à des tubes capillaires de 0,5 mm de diamètre intérieur (cathéters Bruneau).

L'un des tubes est relié au tonomètre d'équilibration, l'autre est relié à une seringue avec laquelle on aspire un aliquot de suspension leucocytaire que l'on veut observer dans la chambre, sous microscope. La chambre doit être la plus petite possible, pour éviter la pénétration des bulles d'air et les phénomènes de capillarité. L'aspiration doit être douce, mais relativement rapide, pour maintenir la viabilité des cellules, empêcher l'hémolyse et éviter toute entrée de bulles. La chambre est placée sous le microscope à contraste de phase dont l'objectif est muni du système décrit ci-dessus. Etant donnée la faible épaisseur de la préparation, le gradient de température en fonction de l'épaisseur est faible. L'image des cellules sanguines est projetée sur un écran de télévision. On prend des calques des cellules toutes les 15 secondes, et au besoin des photos polaroïd avec le système déjà décrit. Avant chaque mesure, on équilibre la chambre avec les gaz standard. La durée d'observation des cellules dans cette chambre est en général brève, elle n'excède pas quelques minutes, pour ne pas permettre des changements progressifs du milieu, en particulier dans l'étude de l'action des gaz anesthésiques, qui peuvent se produire à la longue entre lame et lamelle. Dans les conditions standard, les observations longues sont possibles, nous y reviendrons. A chaque nouvelle observation, la chambre sera changée, que ce soit dans le même milieu, ou dans des milieux différents.

Ce système a permis d'étudier *in vitro* l'action dans le temps, avec phénomènes de réversion, de drogues, de gaz de différentes compositions ou de gaz anesthésiques. Il n'est pas indispensable de l'utiliser pour étudier l'action des agents chimiques, qui ne nécessite pas une équilibration préalable, ni surtout une absence de contact avec l'air ambiant.

## ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES

Les facteurs étudiés agissant sur la mobilité leucocytaire sont de deux ordres : physiques et chimiques.

Tout d'abord, quelques constatations ont permis d'orienter cette étude :

1. Lorsque la température augmente au-dessus de la température ambiante, les leucocytes présentent un mouvement spontané de plus en plus important. La nécessité de contrôler ce facteur physique dans cette étude paraît donc indispensable.

2. Il existe des différences importantes de vitesse de reptation, suivant les donneurs, chez l'homme :

— parfois, en 10 à 15 minutes, les leucocytes neutrophiles s'étaient sur le verre, les autres cellules de la lignée blanche tels les éosinophiles ne s'étaient pas sur le même sang ;

— rarement, les cellules meurent assez rapidement *in vitro*, en 1 à 2 heures, et même moins, la majorité gardant une viabilité de 24 heures (la demi-vie dans la majorité des donneurs est de 24 heures environ). Certaines cellules, chez certains donneurs, restent vivantes et mobiles au bout de quatre jours ;

— enfin, certains donneurs ont des polynucléaires neutrophiles normaux morphologiquement, mais dont la mobilité spontanée est très faible. Il s'agit d'un donneur sur 50 environ, et la vitesse est alors en moyenne de 0,250 à 0,300 microns/sec. L'action des drogues sur ces cellules dénotent une fragilité et les cellules meurent rapidement. Leur vitesse est déprimée par un agent chimique et gazeux, même lorsque cet agent n'agit pas à une concentration donnée sur la majorité des cellules.

Ces trois séries de cas particuliers n'ont pas pu être rattachées :

— à la conformation physique du donneur (obèse, ou maigre),

— au nombre de globules blancs,

— au groupe sanguin,

— à la présence de lipides dans le sang, c'est-à-dire que le donneur soit à jeun, ou en phase post-prandiale.

Ces différences avaient déjà été notées par Houssay, dans sa thèse en 1967. Mais ceci montre la nécessité de faire cette étude sur un grand nombre de cellules. Une étude statistique est indispensable, toutes les expériences étant testées par rapport à des expériences témoins simultanées. Une vitesse moyenne a été déterminée sur plus de 600 échantillons, et les résultats témoins doivent obligatoirement être similaires ou plus exactement statistiquement comparables. Sinon, l'expérience est sans signification et n'est pas utilisée.

**I — Définition d'une vitesse moyenne  
Viabilité in vitro**

**Définition d'une vitesse témoin**

**Diagramme des vitesses au temps O**

**A — Définition d'une vitesse moyenne et témoin, diagramme au temps O**

En 1923, Mac Cutcheon fait un diagramme des vitesses leucocytaires sur 100 cellules. Il est repris sur la figure 12, où la vitesse leucocytaire est en abscisse, et en ordonnée est représenté le nombre de cellules correspondant à une vitesse donnée. La vitesse est représentée en microns par 5 minutes. La méthode utilisée est une méthode d'observation directe. La vitesse moyenne calculée est de 0,507 microns par seconde.

Dans notre série, 690 cellules ont été étudiées durant des intervalles de temps de 2 minutes. Le diagramme représenté sur la figure 13 est du même type que le précédent : en abscisse, la vitesse de locomotion leucocytaire en microns/seconde, en ordonnée le nombre de cellules correspondant. Il s'agit dans l'ensemble d'une courbe Gaussienne, dont le sommet de la cloche se situe entre 0,400 et 0,500 microns/sec. La vitesse moyenne est de 0,427 microns/sec. + ou — 0,004 microns/sec., ce qui représente l'écart-type. La valeur maximale est de 0,670 microns/sec., la valeur minimale de 0,280 microns/sec.

La température est bien entendu constante de 38° C + ou — 0,2° C.

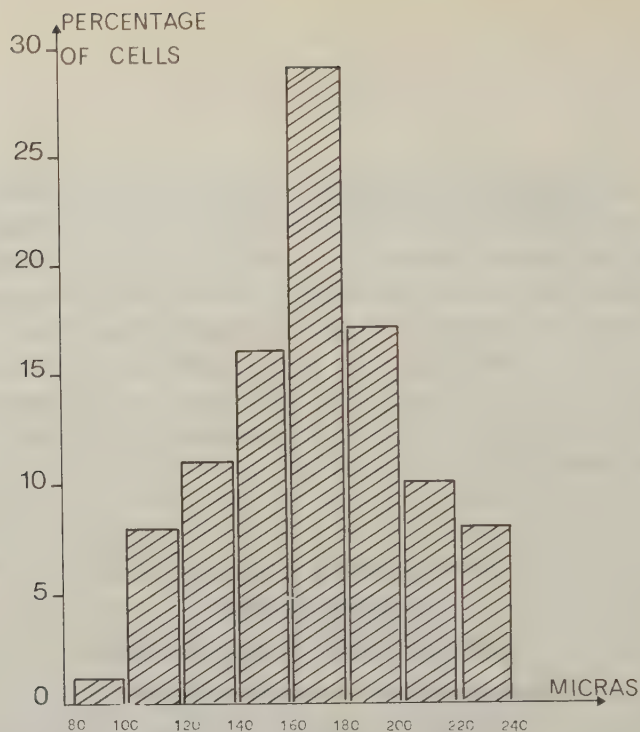


Fig. 12. — Frequency distribution of 100 leucocytes grouped according to distance travelled in 5 minutes. D'après « The normal rate of locomotion of human neutrophilic leucocytes in vitro », Mac Cutcheon (1923)

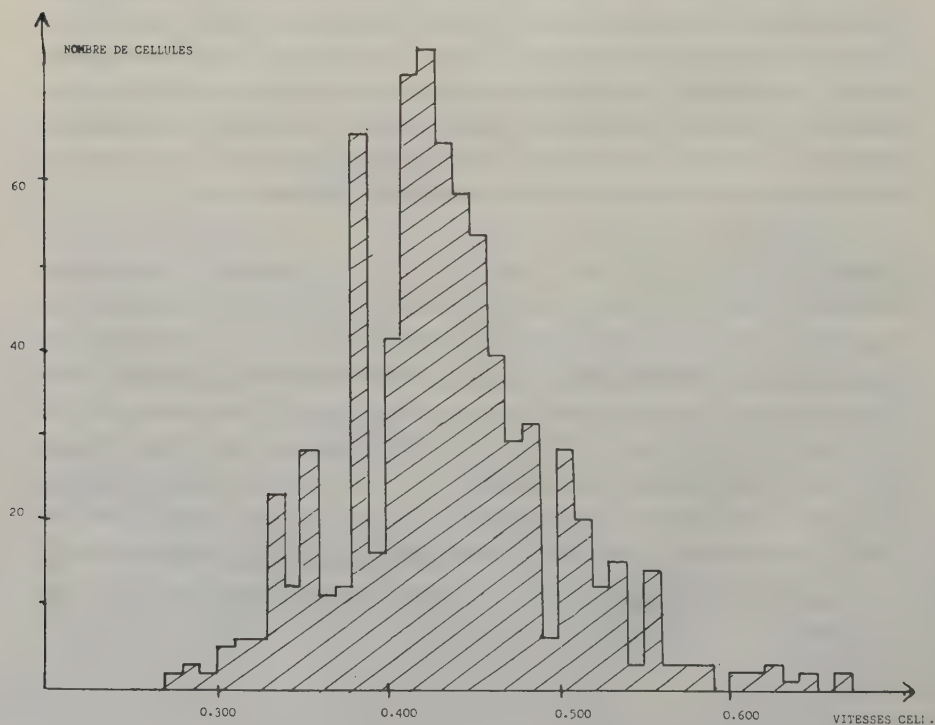


Fig. 13. — Répartition statistique de la vitesse de reptation des polynucléaires neutrophiles, sur 690 cellules (Vitesse moyenne = 0,427 microns/sec. sur 690 cellules)

Parmi les divers chiffres de vitesse moyenne retrouvés dans la littérature, on retrouve (Tableau II) :

TABLEAU II

| Auteurs      | Vitesse microns/sec. | Température °C |
|--------------|----------------------|----------------|
| Commandon    | 0,420                | 35             |
| Mac Cutcheon | 0,600                | 37             |
| Bryant       | 0,650                | 37             |

## B — Viabilité in vitro

— Houssay dans sa thèse sur le nécrotactisme retrouve une motilité vers une cible, qui est une hématie lasée, sur des sangs prélevés entre 2 heures et 50 heures avant l'observation, et des échecs constatés avec des sangs prélevés entre 1 heure et 52 heures avant l'expérience.

— Dans nos séries, il existe des cas particuliers, ci-dessus décrits, mais les observations dans le temps sont moins longues.

La vitesse de locomotion a été étudiée dans le temps par trois séries d'expériences :

a) *Sur la même cellule*, entre lame et lamelle, prise dans une suspension leucocytaire, dans des conditions standard, à 37° C l'épaisseur de la préparation est maximale, de façon à ne pas compromettre la viabilité des PMN. La figure 14 montre cette vitesse dans le temps.

b) *Sur des cellules sédimentant à la température du laboratoire*, c'est-à-dire à 23° C environ, étudiées sous microscope à 27° C (Fig. 15).

d) *Sur des cellules, dans un milieu plasmatique, maintenues à 37° C*, dans un tube à essai, au bain-marie (Fig. 15).

Il ressort de ces trois expériences :

— que les PMN entre lame et lamelle, dans des conditions standard, ont durant deux heures, une vitesse de locomotion constante, puis elle diminue significativement, entre la 2<sup>e</sup> et la 3<sup>e</sup> heure, l'épuisement se fait entre 4 et 5 heures, suivant les cellules ;

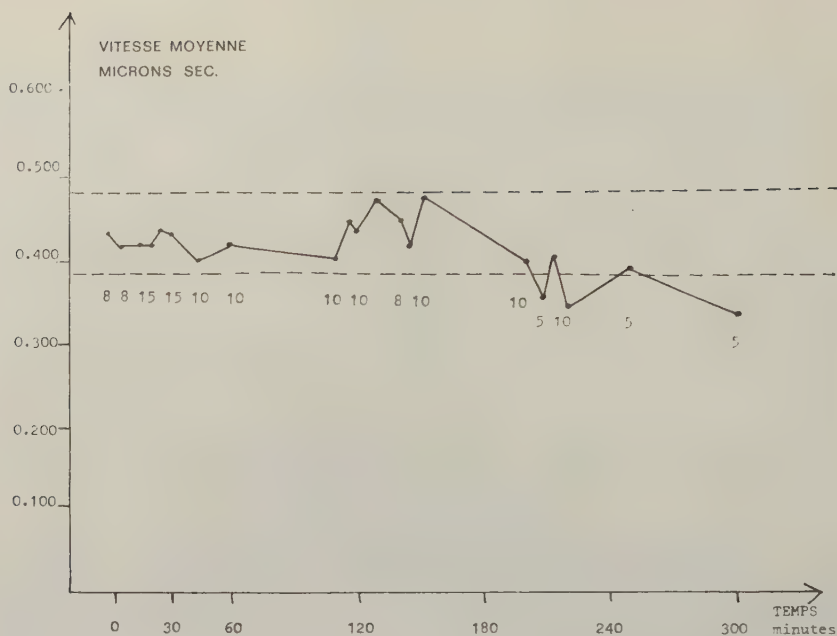


Fig. 14. — Etude réalisée sur plusieurs séries de la vitesse des PMN dans le temps (même leucocyte entre lame et lamelle suivi dans le temps)

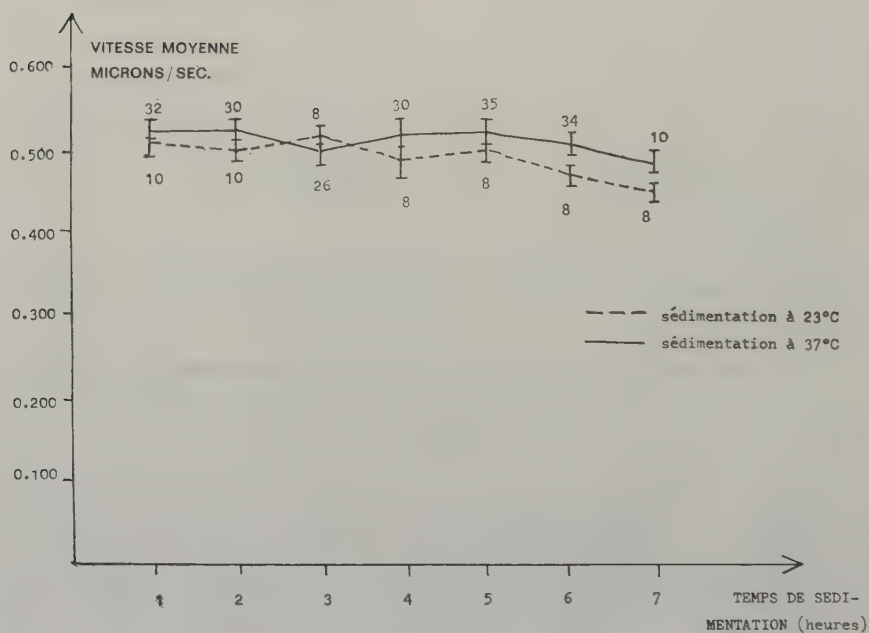


Fig. 15. — Vitesse des PMN dans le temps sur des leucocytes ayant sédimenté à 23° et à 37° C. Les cellules sont observées à 37° C

— que, lorsque les cellules sédimentent in vitro, que ce soit à la température du laboratoire, ou à 37° C, dans un bain-marie, la motilité reste constante durant au moins 7 heures, et il n'y a pas différence significative entre les deux lots cellulaires.

Lorsqu'elles sont maintenues dans un milieu plasmatique à 37° C, dans un bain-marie, leur mobilité reste de même constante durant 7 heures (Fig. 15).

## II — Action des facteurs physiques

Seront successivement étudiées :

— l'influence du milieu d'observation.

— l'action de la viscosité,

— l'action du pH,

— l'action de la température,

— l'interaction pH - température. Essai d'interprétation.

Conclusion sur la conservation des PMN in vitro,

— l'action des ions : en particulier du calcium ; conclusions sur le choix d'un anti-coagulant.

### A — Influence du milieu d'observation

La viabilité des PMN est différente suivant les milieux d'observation. Le tableau suivant individualise ces différences, les PMN ayant été mis en solution depuis une heure dans les milieux suivants (Tableau III) :

— plasma,

— sérum,

— plasmagel (ou gélatine fluide modifiée ou GF M, utilisé comme soluté de remplissage en réanimation),

— sérum physiologique à 9/1 000, isotonique,

— milieu 199 10 C en solution de Barle, avec du rouge phénol (BD Mérieux).

TABLEAU III

| Milieux       | Vitesse moyenne    | Echantillons | Ecart-type |
|---------------|--------------------|--------------|------------|
| Plasma        | 0,427 microns/sec. | 690          | 0,004      |
| Sérum         | 0,408              | 27           | 0,006      |
| Plasmagel     | 0,399              | 30           | 0,008      |
| Sérum physio. | 0,380              | 25           | 0,012      |
| Milieu 199    | 0,387              | 20           | 0,013      |

Le plasma a été choisi comme milieu le plus physiologique et le mieux approprié pour les expériences.

### B — Action de la viscosité du milieu

L'effet de la viscosité du milieu sur la motilité leucocytaire (des PMN) et sur le temps d'apparition des voiles a été étudié par Barat et coll. en 1970.

Les résultats retrouvés sont consignés sur le tableau IV :

TABLEAU IV

| Milieux employés   | Viscosité en centistocks | Nombre de cellules | Temps d'apparition des voiles (sec.) |
|--------------------|--------------------------|--------------------|--------------------------------------|
| Plasma + substosan | 1,74                     | 9                  | 10                                   |
| Idem               | 1,86                     | 9                  | 8                                    |
| Plasma + Méthocel  | 1,82                     | 7                  | 11                                   |
| Idem               | 1,92                     | 3                  | 12                                   |

Les résultats ont permis de conclure que l'augmentation de la viscosité du milieu n'apporte qu'un faible retard à l'apparition des voiles, mais le déplacement des PMN est ralenti dans les milieux les plus visqueux.

### C — Action du pH

Seront successivement étudiées :

- l'action du pH à 37° C,
- l'action du pH à diverses températures.

L'obtention du pH désiré et son contrôle ont été décrits dans la technique. Ces travaux ont été consignés sur des publications : Tannières et coll. en 1970, Nahas et coll. en 1971.

### 1. ACTION DU pH A 37° C :

La courbe représentant l'action du pH sur la vélocité des PMN à une température d'observation de 37° C suit une allure bimodale, avec deux sommets à pH 6,5 et 7,5 et un creux de vitesse à pH 7,0 (Fig. 16).

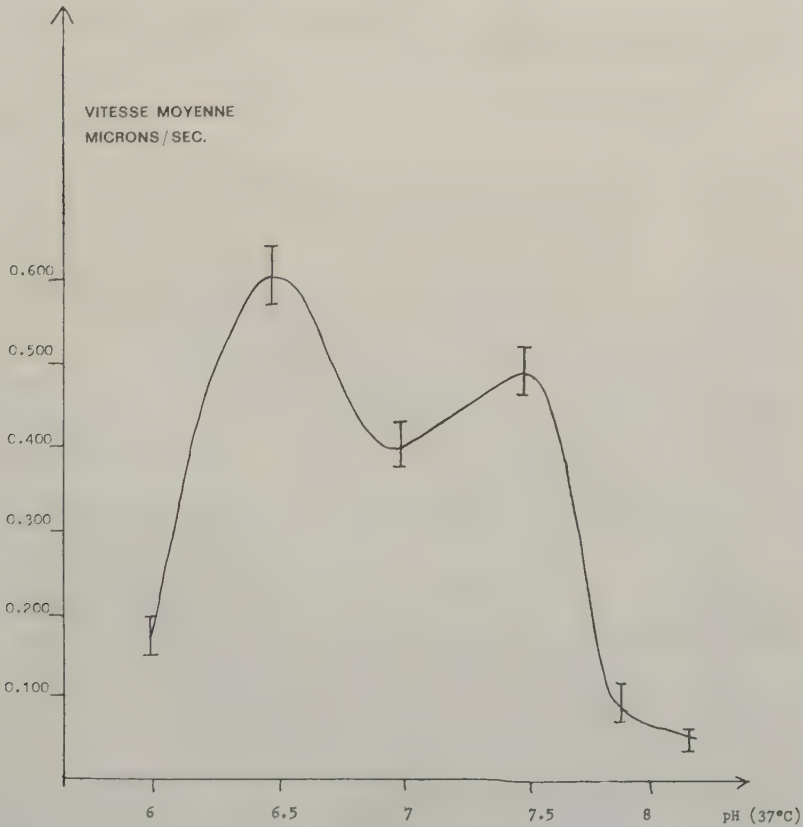


Fig. 16. — Etude de la motilité des PMN en fonction du pH à 37° C

Le nombre de cellules observées est de 20 à 30 pour chaque point. Les écarts représentés correspondent aux écarts-type.

Si la différence entre les vitesses à pH 6,5 et pH 7 est significative, elle l'est moins entre pH 7,0 et 7,5.

Aux pH extrêmes, 6 et 7,8, les vitesses sont faibles, inférieures à 0,200 microns/sec.

C'est à pH 6,5 que la vitesse est la plus rapide, elle est de 0,608 microns/sec. + ou — 0,035.

## 2. ACTION DU pH A TEMPÉRATURES VARIABLES (Fig. 17) :

A différentes températures, de 8° C à 46° C, la courbe vitesse des PMN en fonction du pH suit toujours une allure bimodale, avec les mêmes inflexions, mais les maxima sont plus ou moins bien marqués.

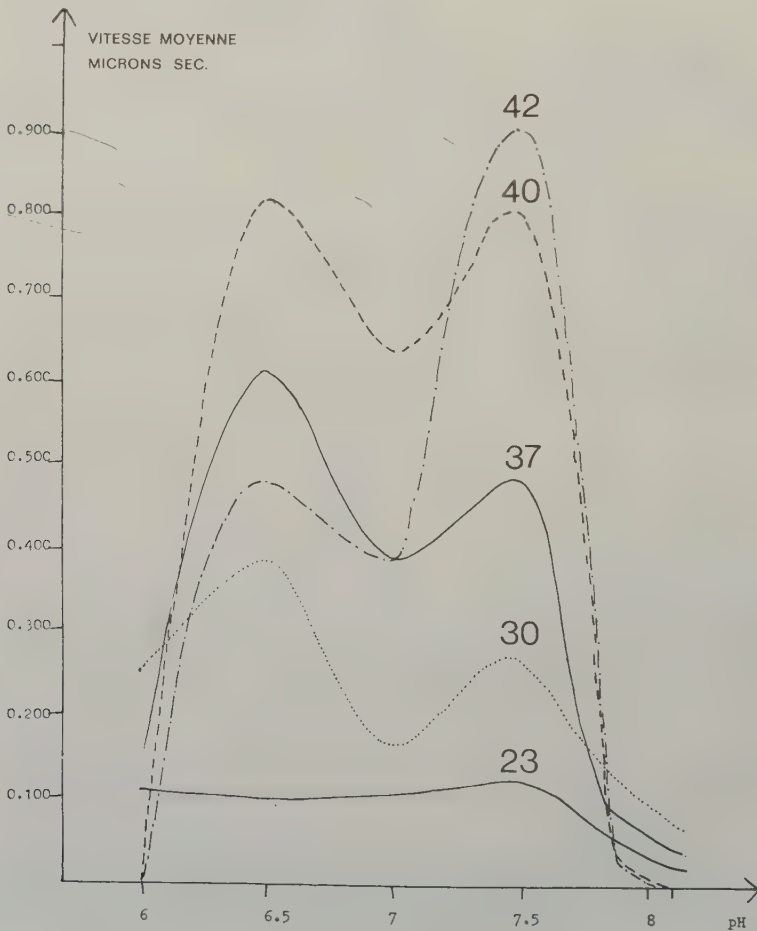


Fig. 17. — Action du pH sur la motilité des PMN à différentes températures

A 23° C, la vitesse est quasiment la même de pH 6 à pH 7,5, c'est-à-dire à environ 0,100 microns/sec. Par contre au-dessus de 7,5, elle est bien inférieure, les PMN restant pratiquement sur place aux pH 7,8 et pH 8,2.

De 30° C à 42° C, les courbes sont bimodales, alors que les vitesses sont bien entendu plus élevées, plus la température monte. Par ailleurs plus la température augmente, plus le maximum à pH 7,5 est élevé par rapport à celui à pH 6,5.

De cet ensemble de courbes, on conclut :

a) Que les cellules supportent in vitro, et à des températures physiologiques beaucoup mieux les pH acides, que les pH alcalins : la vitesse chute très brutalement lorsque l'on dépasse le pH 7,6.

On sait par ailleurs qu'in vitro, lorsque le sang sédimente à l'air libre, le pH sanguin devient alcalin, par libération de CO<sub>2</sub>.

b) Que le pH entraîne des modifications morphologiques.

Aux pH plus acides, les PMN s'étirent, les voiles sont plus nombreux et plus rapidement formés.

Aux pH alcalins, par contre, les cellules deviennent beaucoup plus arrondies.

c) Enfin, qu'il existe une interaction pH-température sur la motilité leucocytaire.

Plus on augmente la température, moins les PMN supportent les pH acides, il existe donc une synergie température élevée - pH acide, nous le reverrons plus loin.

### 3. TRAVAUX ANTÉRIEURS :

En 1933, Pits et Mast ont étudié l'action de la concentration des ions H<sup>+</sup> sur les processus physiologiques de l'amibe.

Ils ont retrouvé que le pH agit sur la vitesse de locomotion de l'amibe suivant une courbe bimodale avec deux sommets, à pH 6,5 et 7,5 (Fig. 18).

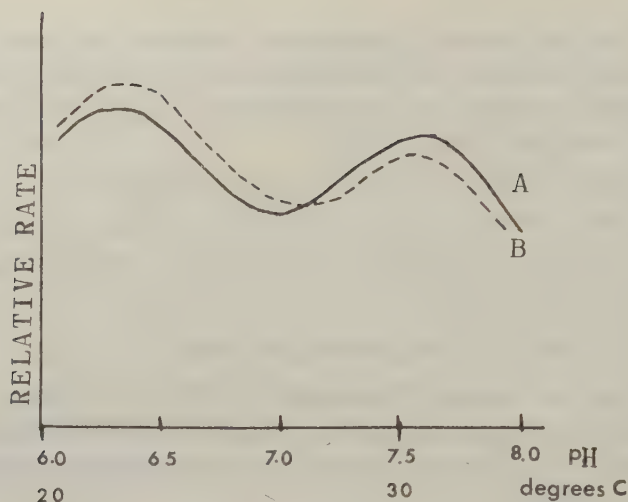


Fig. 18. — D'après Pitts et Mast (1933) :

A : vitesse de locomotion des amibes en fonction du pH

B : vitesse de locomotion des amibes d'après la température

En 1954, Mommerts et coll. ont montré que la courbe d'action du pH sur les ATPéases membranaires (qui sont indispensables à l'utilisation de l'ATP, pour la transformation en AMP 3'5' cyclique) suivent une courbe bimodale identique avec deux sommets, à pH 6,5 et 8. D'autres cations participent d'ailleurs à cette action, mais leur rôle n'est pas connu.

Il semblerait donc que ce phénomène ne soit pas strictement leucocytaire, mais protoplasmique, et que l'ATPéase membranaire pourrait participer à cette action.

D'autres auteurs ont étudié *in vitro* l'action du pH sur la vitesse leucocytaire, en particulier :

Bryant et coll. en 1966 : les PMN sont obtenus par sédimentation du sang hépariné. Ils n'ont pas trouvé de diminution de la vitesse leucocytaire en pH acide (6,3 à 6,5) par addition d'acide chlorhydrique ou bétahydroxy-butyrique. La méthode employée est indirecte, dérivée de la méthode de Boyden, avec un temps d'expérience de 1 à 4 heures.

Phelds et coll., en 1969, trouvent des variations certaines, mais peu importantes par rapport à la mobilité au pH physiologique. Ils retrouvent dans l'ensemble de leurs expériences deux pics de vitesse, l'un à pH 7 et l'autre à pH 7,3.

Ces deux études ont été faites à 37° C.

## D — Action de la température

Si les courbes de vitesse en fonction du pH sont identiques pour l'amibe et le polynucléaire, il n'en est pas de même pour les courbes de vitesse en fonction de la température. Elle suit une allure bimodale pour l'amibe, alors que pour le PMN elle suit une allure accélérée, avec deux changements de pente à 23° C et 37° C, pouvant être comparée à une multiexponentielle. La figure 19 la représente.

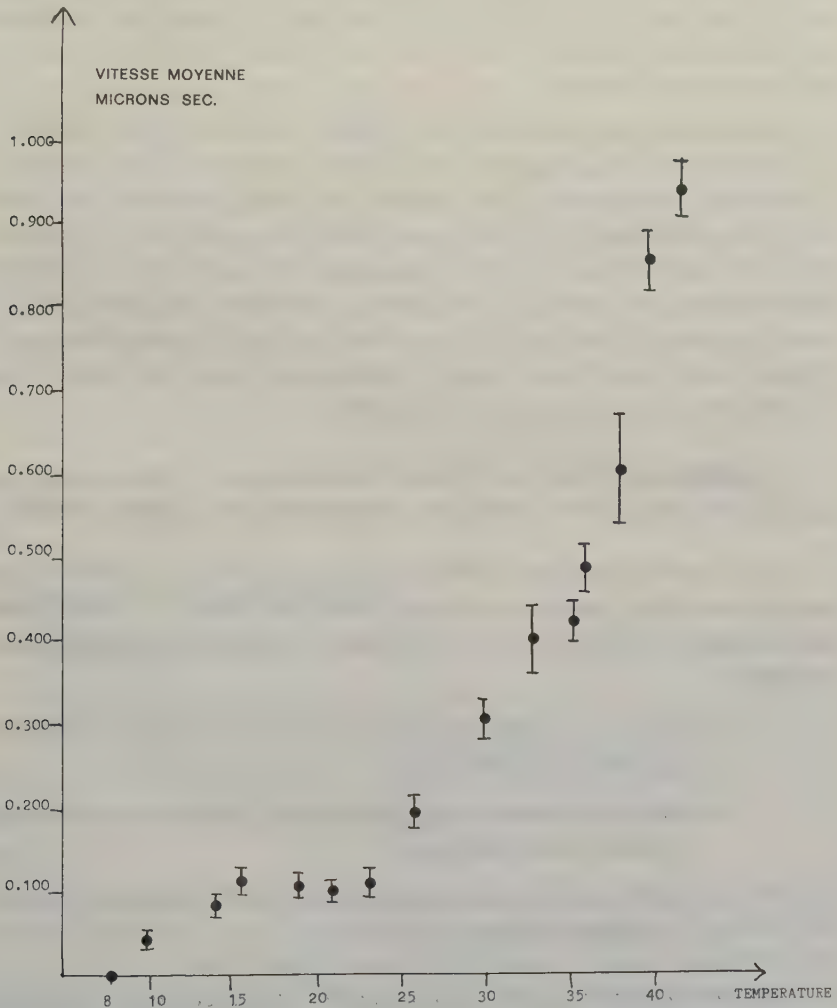


Fig. 19. — Action de la température sur la motilité des PMN au pH physiologique

## 1. ACTION DE LA TEMPÉRATURE AU pH PHYSIOLOGIQUE :

La vitesse est de 0,000 microns/sec. à 8° C et en dessous. On obtient une réversibilité de 8° C à 0° C en chauffant doucement la préparation, ce qui montre que l'absence de mouvements spontanés pseudopodiques à ces températures ne signifie pas la mort cellulaire. Par ailleurs, les polynucléaires se mettent en sphère et les mouvements intracellulaires sont ralentis, mais non abolis. Il n'existe pas de phagocytose visible en dessous de 8° C. De 8° C à 42° C, la vitesse de reptation ne cesse de croître, suivant un mode accéléré jusqu'à 0,940 microns à 42° C.

Deux changements de pente sont nets sur cette courbe : à 23° C et à 37° C. Après 42° C, où la vitesse est maximale, il existe une décroissance très rapide ; la mort cellulaire survient, de façon irréversible à 46° C, ce qui correspond à la température de destruction de toutes les protéines. Dès que la courbe descendante est amorcée, la mort cellulaire survient rapidement, même si l'on remet des cellules à une température inférieure. Les structures vitales cellulaires sont atteintes. Ces conditions ne sont pas physiologiques.

Quelques auteurs ont étudié l'action de la température sur la motilité des PMN ou sur le chimiotactisme. Nous citerons :

a) *Commandon*, en 1914, trouve qu'à 12° C, les PMN n'ont pas de motilité, mais des changements sur place. Le maximum de vitesse étant à 38° C. Il n'a pas étudié les vitesses supérieures.

A 25° C, la vitesse moyenne est de 10 microns/minute  
(0,200 microns/sec.).

A 30° C, la vitesse moyenne est de 20,5 microns/minute  
(0,400 microns/sec.).

A 35° C, la vitesse moyenne est de 25 microns/minute  
(0,420 microns/sec.).

b) *Mac-Cutcheon*, en 1923, observe les PMN durant 5 minutes, par méthode directe.

Le tableau V exprime les résultats obtenus.

TABLEAU V

| Tempé-<br>rature | Distance travelled<br>in 5 minutes | Tempé-<br>rature | Distance travelled<br>in 5 minutes | Q 10 |
|------------------|------------------------------------|------------------|------------------------------------|------|
| °C               | Micra                              | °C               | Micra                              |      |
| 23               | 42,8 + ou — 2,6                    | 37               | 186,0 + ou — 4,4                   | 2,86 |
| 27               | 86,7 + ou — 3,2                    | 37               | 174,1 + ou — 5,0                   | 2,01 |
| 31               | 133,2 + ou — 3,0                   | 37               | 195,2 + ou — 4,2                   | 1,89 |
| 33               | 131,8 + ou — 4,2                   | 37               | 176,1 + ou — 2,8                   | 2,06 |
| 40               | 197,3 + ou — 4,1                   | 37               | 160,2 + ou — 6,9                   | 2,00 |
| 42               | 153,3 + ou — 6,8                   | 37               | 173,4 + ou — 4,3                   | 0,78 |

c) *Bryant*, en 1966, retrouve une accélération importante de 25 à 40° C, qui augmente de 10 % environ, il obtient une vitesse de 0,100 microns/sec., à 20° C (observation sur 4 heures), et à 0,650 microns/sec. à 37° C. Il ne précise pas le moyen qu'il emploie pour mettre en température la préparation, ni pour la contrôler. Par ailleurs, si les résultats sont ceux-là à 1 heure, en faisant la moyenne, sur 4 heures, ils sont différents puisqu'à 37° C, la vitesse calculée n'est plus que de 0,250 microns/sec.

d) *Phelds*, en 1969, a retrouvé des résultats identiques.

Dans l'ensemble, les résultats sont concordants, bien que les chiffres soient différemment évalués.

## E — Interaction pH - température

Elle est différemment représentée sur la figure 20.

Plusieurs remarques peuvent être faites :

a) Aux pH 5,6 et 7 et au pH physiologique 7,5, les courbes d'action de la température sur la vitesse leucocytaire sont comparables. Elles comportent un ou deux changements de pente.

b) Plus le pH est acide, plus les courbes sont déplacées vers la gauche, ce qui signifie qu'à des températures supérieures à 37° C, et à pH acide, les cellules sont plus rapidement détruites, le maximum d'activité cellulaire correspond à une température inférieure à 42° C pour les pH plus faibles : 40° C à pH 6,5 ; 38° C à pH 7.

Par contre, aux températures basses, proches de la température ambiante, non physiologiques, les pH 6 et 7,9 n'ont quasi aucune action sur la vitesse des PMN. Elle reste vers 0,200 microns/sec.

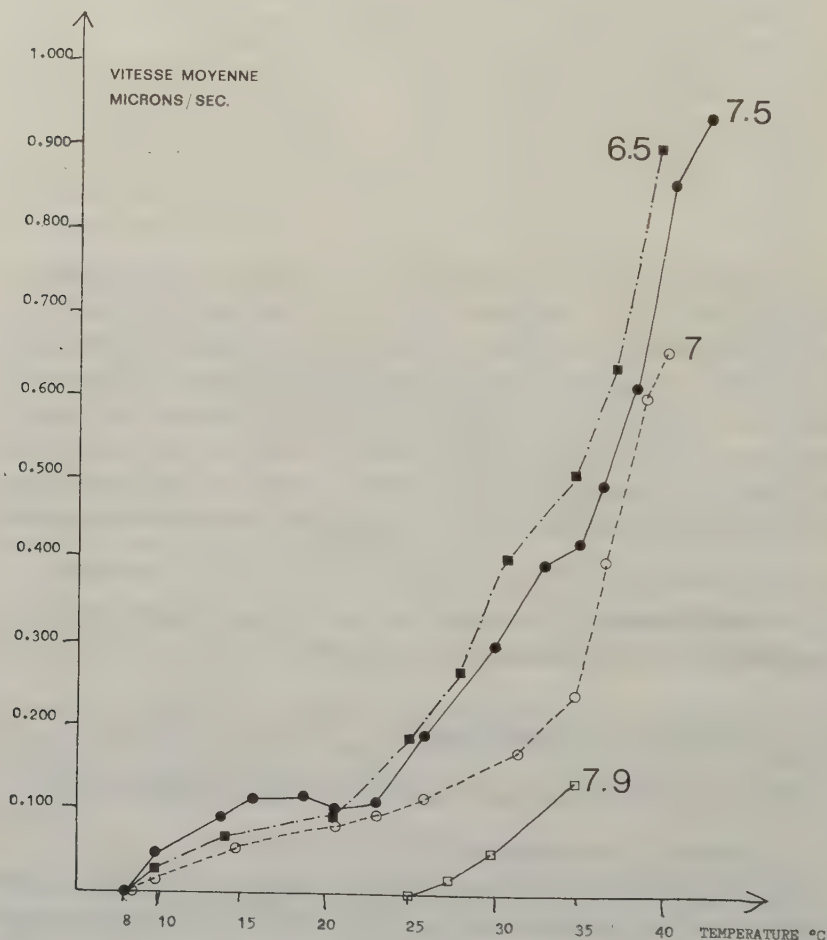


Fig. 20. — Action de la température sur la motilité des PMN à différents pH

c) La vitesse est de 38° C de 0,561 microns/sec. ( $\pm 0,025$ ) à pH 7 ; de 0,861 microns/sec. ( $\pm 0,035$ ) à pH 6,5.

d) Aux pH 7,9 et 6, les courbes sont des sigmoïdes (la première partie seulement compte).

## F — Correction du pH en fonction de la température

Le pH est mesuré par un appareil Eschweiller (Combi-  
v Analyseur Eschweiller Verfilco), qui détermine le pH à  
37° C, en microéchantillons. Il faut donc corriger les chiffres  
de pH en fonction de la température de la préparation.

Le pH s'élève linéairement avec la chute de la température,  
et le pH observé à 38° C est donc plus bas que le pH réel, à la  
température du milieu d'observation.

En 1948, Rosenthal établit une relation entre le pH san-  
guin réel et le pH à 38 C en fonction de la température :

$\text{pH}_{38} \text{ du sang} = \text{pH}_t - 0,0148 (38 - t)$  où  $t$  est la tempé-  
rature d'observation.

La correction qu'il faut faire, lorsqu'il s'agit du plasma, est  
différente : c'est celle que l'on utilisera :

$$\text{pH}_{38} \text{ du plasma} = \text{pH}_t - 0,0118 (38 - t)$$

De même, Kelman, en 1966, a tracé des normogrammes de  
l'action de la température sur le pH.

## G — Notion de Q 10 — Accélération de la vitesse leucocytaire par la température

### 1. DÉFINITION DU Q 10 :

Fenn, en 1922, a utilisé la formule de Madsen et Watabiki,  
d'après la loi de Vant' Hoff, qui dit qu'une réaction chimique  
est doublée ou triplée par une augmentation de température de  
10° C, et la met en pratique pour l'étude de la phagocytose en  
fonction de la température.

Elle est formulée de la façon suivante :

$$\text{Log Q 10} = \frac{\text{Log K 1} - \text{log K 2}}{t 1 - t 2} \times 10$$

où K 1 est la vitesse la plus grande ( $t 1$ ),

K 2 est la vitesse la plus faible ( $t 2$ ).

Le Q 10 correspond à la pente en semi-logarithme de la  
courbe.

Après corrections dues à la viscosité, du fait du nombre des collisions bactéries-PMN, il trouve :

un  $Q_{10}$  de 4,6 entre  $25^{\circ}\text{C}$  et  $30^{\circ}\text{C}$

vis-à-vis des bactéries.

1,5 entre  $30^{\circ}\text{C}$  et  $35^{\circ}\text{C}$

Dans le cas des particules amorphes, testant la phagocytose, il est entre 6 et 8 entre  $15^{\circ}\text{C}$  et  $20^{\circ}\text{C}$ .

Alors qu'il augmente entre 20 et  $27^{\circ}\text{C}$ , et même atteint 14, puis diminue de  $27^{\circ}\text{C}$  à  $35^{\circ}\text{C}$ , il est alors de 3,2 de moyenne.

La vitesse de phagocytose est la pente obtenue sur une courbe représentant le temps en abscisse et le pourcentage de particules phagocytées en ordonnée (25 %, 50 %, 75 %).

## 2. CALCUL DU $Q_{10}$ A $\text{pH} = 7,5$ :

La figure 21 représente le logarithme des vitesses en ordonnée ; en fonction de la température, en abscisse. Elle montre ainsi plus aisément le calcul du  $Q_{10}$  à  $\text{pH} = 7,5$ .

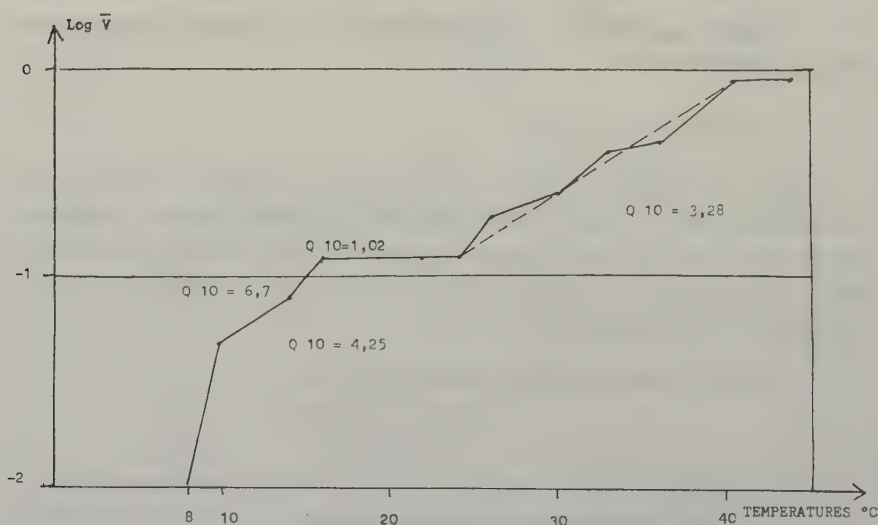


Fig. 21. — Calcul du  $Q_{10}$  de la motilité des PMN en fonction de la température au  $\text{pH}$  physiologique (7,5)

Sur la figure 19, on remarque :

— qu'il existe deux changements de pente, qui correspondent à des variations de Q 10 : entre 10° C et 16° C le Q 10 est de 5, entre 16° C et 24° C le Q 10 est de 1,04. Il existe un plateau, mieux visualisé sur la figure 21 où la courbe est horizontale. Entre 24° C et 42° C, le Q 10 est égal à 3,2 ;

— au-dessous de 10° C, le Q 10 est très élevé, mais ininterprétable ;

— au-dessus de 40° C, le Q 10 diminue, ce qui montre que, de 40° C à 42° C, les cellules sont rapides, mais la viabilité cellulaire commence à diminuer, probablement du fait de la diminution d'activité de certains systèmes enzymatiques ;

— enfin, il semble que plusieurs systèmes enzymatiques soient mis en jeu entre 10° C et 16° C, et d'autres, peut-être différents, entre 24° C et 32° C. Il serait intéressant de les bloquer par des inhibiteurs connus.

### 3. CALCUL DES Q 10 AUX AUTRES pH (Tableau VI) :

TABLEAU VI

| pH  | Températures      | Q 10 |
|-----|-------------------|------|
| 6   | 16° C ... 23° C   | 8,2  |
|     | 23° C ... 31° C   | 2,8  |
| 6,5 | 10° C ... 23° C   | 1,9  |
|     | 23° C ... 31° C   | 3,1  |
|     | 31° C ... 37° C   | 4,2  |
|     | 37° C ... 39° C   | 3,2  |
| 7   | 10° C ... 15° C   | 3,5  |
|     | 15° C ... 32° C   | 1,7  |
|     | 32° C ... 37° C   | 8,2  |
|     | 37° C ... 38,5° C | 8,0  |

Cette action de la température sur la vitesse des PMN n'est pas spécifique à l'homme, ni aux animaux à sang chaud. Chez la grenouille, elle agit de la même façon, comme le montre la figure 22. Il existe deux changements de pente.

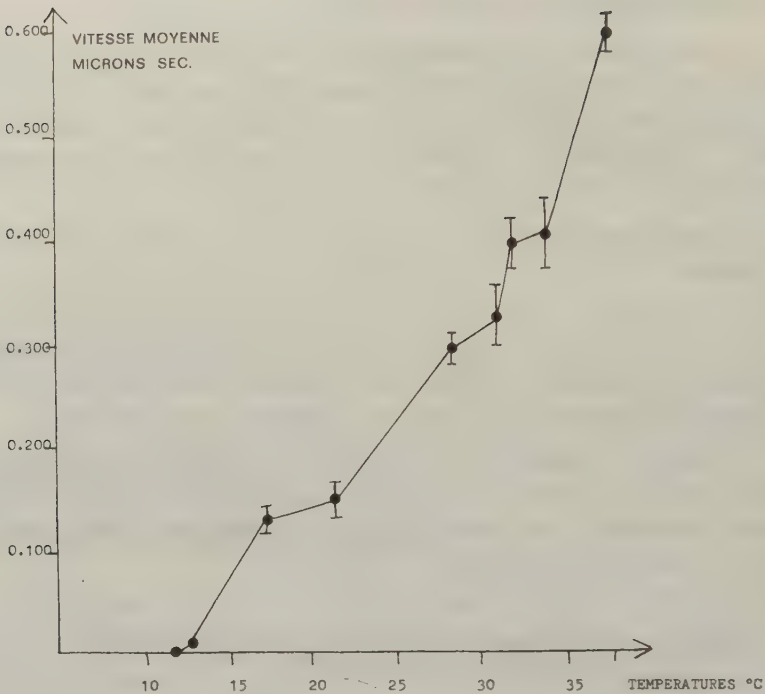


Fig. 22. — Action de la température sur la motilité des PMN chez la grenouille

En conclusion, il existe une interaction nette pH-température qui montre que la vitesse de reptation du PMN humain est nettement accélérée par la température entre 25° C et 32° C, et par le pH acide. Il convient donc de contrôler ces facteurs dans toute étude in vitro de la motilité leucocytaire, et en général, dans toute étude in vitro des leucocytes à l'état vivant.

Ce contrôle a été rigoureux et a permis d'étudier l'action de drogues chimiques et gazeuses sur la motilité leucocytaire dans des conditions standard, constantes et contrôlables. Il reste à choisir le meilleur anticoagulant sur lequel on va prélever le sang humain.

#### H — Choix de l'anticoagulant — Action du calcium

La présence de calcium dans le milieu est importante dans l'étude de la motilité leucocytaire.

On a étudié à 37° C la motilité leucocytaire en présence de 4 sortes d'anticoagulants (Tableau VII) :

TABLEAU VII

| Anticoagulant                                           | Concentration                 |
|---------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Calciparine<br>(héparinate de calcium<br>Choay CY 55 B) | 25 U/ml soit<br>25 $\mu$ g/ml |
| Héparine                                                | 50 $\mu$ g/ml                 |
| Citrate de Na +                                         | 4 mg/ml                       |
| EDTA calcique                                           | 25 $\mu$ g/ml                 |

Les cellules ont été étudiées durant une heure, incubées à 37° C dans du plasma. Le sang a été prélevé sous anticoagulant. La première mesure est prise après une sédimentation du sang de 1 heure. La figure 23 représente les résultats obtenus :

— avec l'héparine et la calciparine, la motilité spontanée est constante en 1 heure, comprise dans les valeurs moyennes de vitesse obtenues sur un grand nombre d'échantillons ;

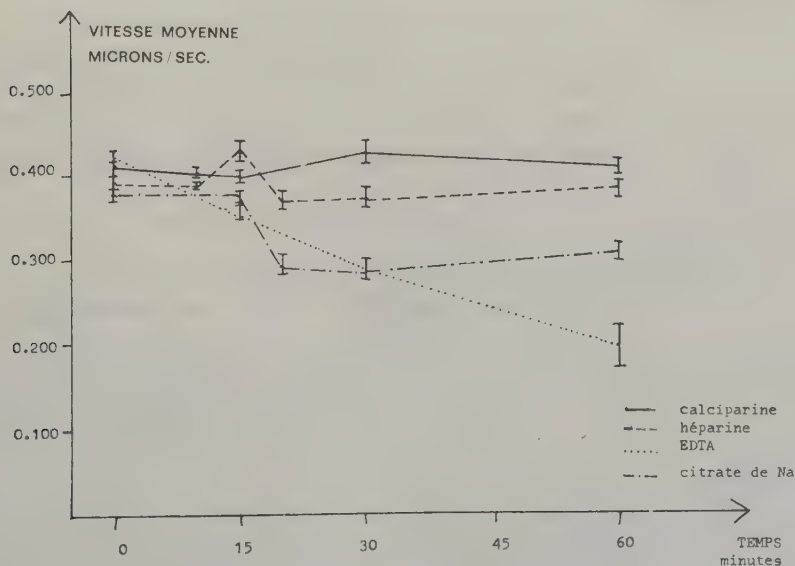


Fig. 23. — Influence des anticoagulants sur la vitesse leucocytaire

— par contre, avec le citrate de sodium, si la vitesse de départ au point 0, c'est-à-dire au bout d'une heure de sédimentation, est normale, on observe dans le temps une décroissance correspondant à un épuisement cellulaire.

Ce phénomène est encore plus marqué avec l'E D T A qui est un puissant chélateur du calcium.

Ceci permet de conclure :

— l'héparinisation est la meilleure façon d'anticoaguler un sang que l'on veut observer in vitro à l'état vivant, pour la conservation des PMN ;

— que la présence de calcium en quantité importante dans le milieu (calciparine) n'influence pas la vitesse des PMN. Bryant, en 1966, montre qu'elle n'influence pas non plus la phagocytose à la concentration de 21 mg/100 ml ;

— que, par contre, la chélation du  $\text{Ca}^{++}$ , soit par le citrate qui complexe le calcium plasmatique, soit par l'E D T A, entraîne un épuisement cellulaire en 1 heure d'observation, c'est-à-dire après 2 heures de contact ;

— l'action des autres ions sur la motilité leucocytaire n'a pas été étudiée.

## DEUXIEME PARTIE

### RESULTATS

La technique d'étude d'une ambiance gazeuse sur la motilité leucocytaire a été décrite plus haut. Le pH est maintenu relativement constant. Il est physiologique. La température est comprise entre 37° C et 37,2° C.

La vitesse leucocytaire moyenne est de 0,427 microns/sec. sur 690 échantillons. Dans toutes les expériences, on rince tout d'abord les deux tonomètres et les deux chambres d'observation avec les gaz témoins utilisés, en l'occurrence :

- soit O<sub>2</sub> : 19 %, CO<sub>2</sub> : 5 %, N<sub>2</sub> : 76 %,
- soit carbogène : O<sub>2</sub> : 95 %, CO<sub>2</sub> : 5 %.

On remplit ensuite les tonomètres de suspensions cellulaires, puis on remplit les chambres d'observation avec le procédé ci-dessus décrit. Ensuite, les cellules sont en contact 10 minutes avec le gaz témoin, puis l'échantillon 0 est pris, les autres suivent à des intervalles de temps fixes.

*Nous étudierons successivement :*

- le comportement des leucocytes dans diverses ambiances gazeuses, enrichies ou pauvres en oxygène ;
- le comportement des leucocytes, en contact avec divers gaz anesthésiques, en particulier : éther, chloroforme, gaz halogénés : Halothane, Methoxyflurane.

# I — Action de diverses ambiances gazeuses sur la motilité leucocytaire

## A — Etude de l'action sur la motilité leucocytaire du carbogène

Le carbogène contient 95 % d'oxygène et 5 % de  $\text{CO}_2$ , ce qui permet de maintenir un pH stable. Les vitesses leucocytaires en présence de carbogène sont plus élevées que les vitesses leucocytaires où les PMN sont en contact avec 75 % d' $\text{N}_2$  et 19 % d'oxygène.

Les chiffres sont plus élevés à tous les temps, mais de manière non significative, pour les échantillons calculés.

La figure 24 montre les deux courbes en parallèle.

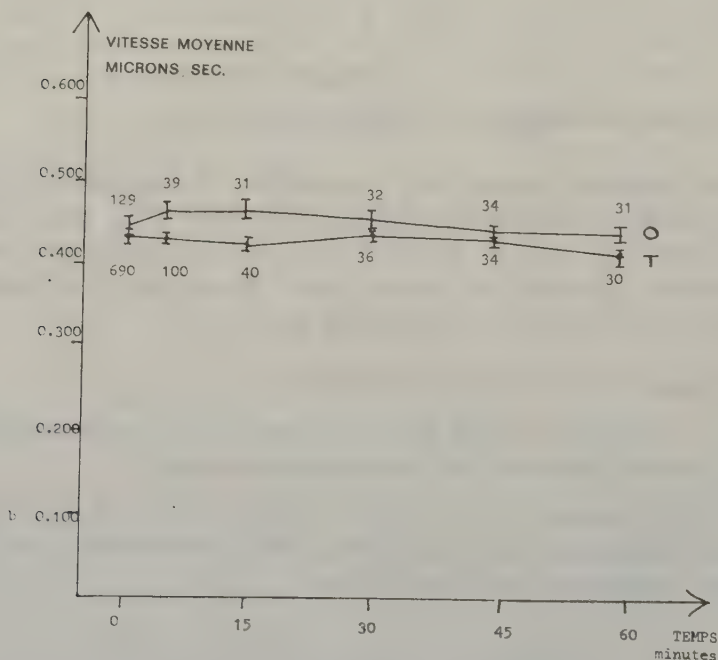


Fig. 24. — Témoins dans le temps dans un mélange gazeux standard et en présence de carbogène

## B — Etude en anaérobie stricte

En anaérobie stricte, correspondant à 95 % d'azote et 5 % de  $\text{CO}_2$ , les PMN ont une viabilité diminuée, lorsqu'ils sont en suspension dans le plasma. En 50 minutes, ils ne bougent plus mais cette immobilité est réversible pour certains lorsqu'ils sont remis dans une atmosphère gazeuse oxygénée. La réversion est de 35 % environ sur 20 échantillons.

La courbe descendante est amorcée à 40 minutes. La pente est très forte.

Jusqu'à 40 minutes, leur motilité est significativement identique à la motilité témoin. A 40 minutes, la réversibilité est grande (83 % des cellules sur 20 échantillons).

Si l'on remplace la suspension leucocytaire par du sang complet, la viabilité est beaucoup plus grande, puisqu'on observe une absence de motilité à 2 heures 50 minutes seulement.

On peut donc en conclure que les PMN s'épuisent en anaérobie, rapidement s'ils sont en suspension, plus lentement sur sang complet, la source d'oxygène nécessaire à leur métabolisme étant probablement puisée dans les hématies.

La figure 25 représente l'épuisement de la motilité des PMN en suspension dans du plasma, en anaérobie.

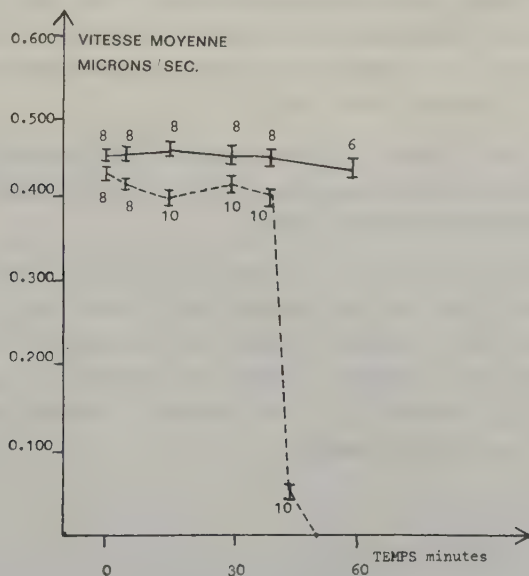


Fig. 25. — Mobilité des PMN en suspension dans le plasma en anaérobie stricte

## C — Etude en présence de certaines substances énergétiques

Certains témoins ont été étudiés dans le milieu gazeux standard (75 % N<sub>2</sub>, 5 % CO<sub>2</sub>, 19 % O<sub>2</sub>) en présence de certaines substances énergétiques en particulier l'AMP 3'5' cyclique, participant au métabolisme cellulaire. L'AMP cyclique a été utilisé aux concentrations de 10<sup>-3</sup> et 5.10<sup>-3</sup> Molaire sous forme diburylée et non dibutirylée, la forme dibutirylée passant plus aisément la membrane des PMN que la non dibutirylée.

Les résultats sont significativement semblables aux résultats témoins dans le temps. Dans certaines conditions particulières, ils sont différents, nous le verrons.

## II — Etude de l'action des gaz anesthésiques sur la motilité des PMN

### A — L'éther

Il a été testé à deux concentrations différentes : 15 volumes pour mille et 21 volumes pour mille. Les figures 26 et 27 représentent l'action de l'éther à ces deux concentrations, en phase gazeuse sur la motilité des PMN.

a) A 15 vol./mille, il n'y a aucune différence significative avec le témoin dans le temps au bout de 60 minutes : ni dépression ni excitation de la motilité ;

b) A 21 vol./mille, par contre, l'action est nette (Fig. 27). Elle se traduit par une dépression de la trentième à la soixantième minute, qui se termine par la mort cellulaire à 60 minutes. C'est une toxicité cellulaire directe de l'éther en phase gazeuse, qui n'est plus réversible à 50 minutes, lorsque la courbe a amorcé sa pente décroissante.

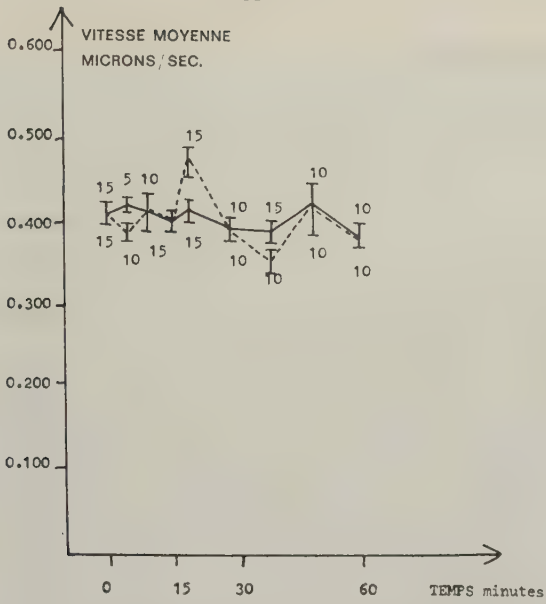


Fig. 26. — Action de l'éther en phase gazeuse (15 vol./1 000) sur la vitesse des PMN

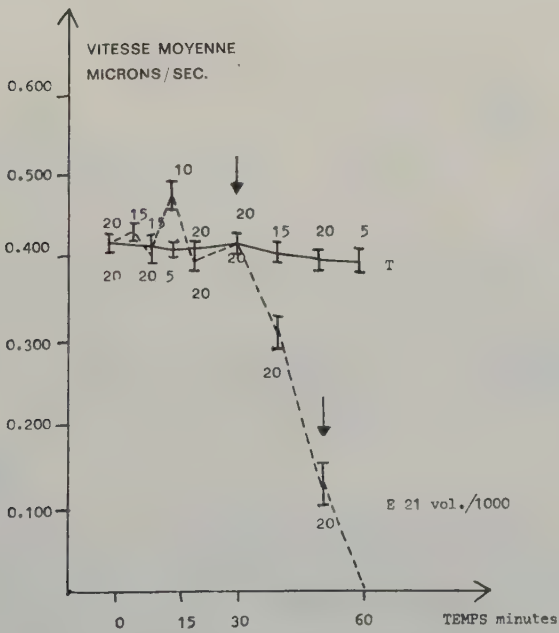


Fig. 27. — Action de l'éther en phase gazeuse (21 vol./1 000) sur la vitesse des PMN

## B — Le chloroforme

Il n'a pas été testé dans cette étude.

Nous reprendrons les travaux de Lowenbourg en 1934.

Il a observé directement les PMN humains, et calculé la vitesse par des calques successifs, par une technique similaire.

Les globules blancs sont directement mis en contact avec le chloroforme, en phase liquide. Les figures 28 et 29 représentent les résultats obtenus :

— sur la figure 28, les mouvements cellulaires exprimés directement ;

— sur la figure 29, une courbe représentant la vitesse leucocytaire, en fonction de la concentration du chloroforme, exprimée en molarité.

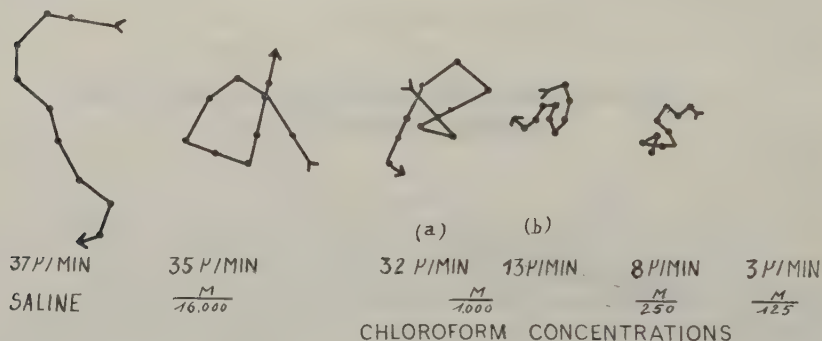


Fig. 28. — Mouvements cellulaires pendant des périodes de 10 minutes à diverses concentrations de chloroforme : d'après Lowenbourg en 1934

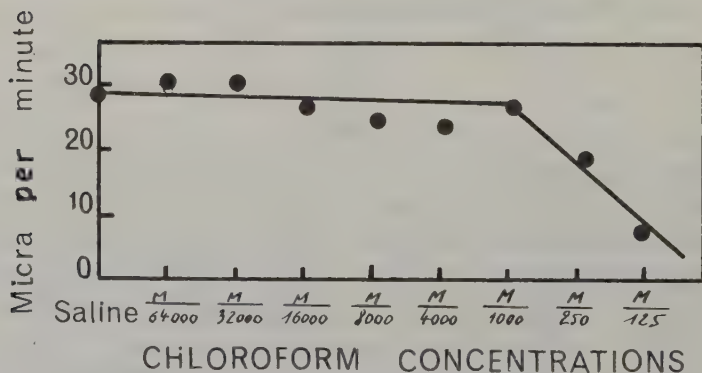


Fig. 29. — Vitesse moyenne de locomotion en fonction de la concentration en chloroforme : d'après Lowenbourg en 1934

L'action se manifeste donc par une dépression à partir de la concentration M/250 ; aucune concentration n'augmente la vitesse de reptation. Les concentrations inférieures à M/250 n'ont aucun effet sur la vitesse.

### C — Le protoxyde d'azote

C'est un gaz incolore à odeur de sucre légèrement brûlé. Il ne se combine pas avec l'hémoglobine et se dissout intact dans le plasma sanguin. Il est très employé en anesthésie.

Ses propriétés hématologiques ont été reconnues en 1956, par Lansen et coll. Lors de l'inhalation prolongée de protoxyde d'azote, à la concentration de 50 %, au cours de tétanos, ils ont observé une agranulocytose, le chiffre des globules blancs étant de 2 000 à 4 000 éléments/mm<sup>3</sup>. Plus récemment, en 1963, Green et coll. ont démontré chez les rats albinos, soumis durant six jours à un mélange de 80 % de N<sub>2</sub>O et 20 % d'oxygène, la diminution du nombre de globules blancs dans le sang périphérique, à 10 % de leur valeur initiale. La moelle osseuse montrait alors une érythropoïèse de type mégaloblastique et les granulocytoses prenaient un aspect rencontré dans les anémies pernicieuses.

Par ailleurs, Henry et coll., en 1969, retrouvent une diminution de la résistance à des infections respiratoires à *Klebsiella Pneumoniae* significative, après une période d'exposition de 30 à 60 minutes avec 10 à 50 % de protoxyde d'azote.

Valand, en 1970, démontre qu'il existe une diminution de réponse à une infection virale à Para Influenza 3 chez les lapins, après une exposition de 96 heures avec 25 % de protoxyde d'azote.

Dans cette série d'expériences étudiant l'action de gaz anesthésiques sur la motilité leucocytaire, l'action du protoxyde d'azote paraît intéressante.

Plusieurs faits sont à noter :

1. En présence de protoxyde d'azote pur, les leucocytes sont rapidement détruits, comme le montre la figure 30 ; la motilité spontanée décroît en 5 minutes à 0,050 microns/sec., c'est-à-dire à 12 % environ de la valeur témoin. La vitesse reste de l'ordre de 5 à 12 % de la valeur témoin de la cinquième à la qua-

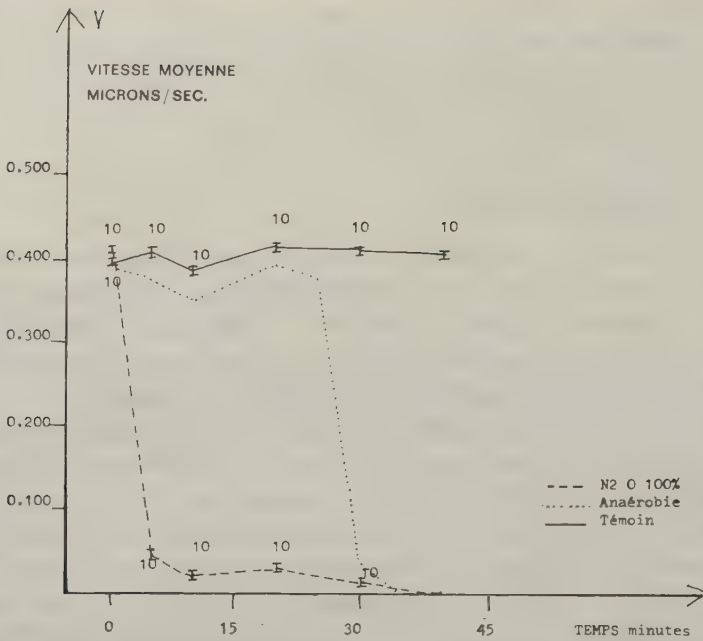


Fig. 30. — Action du protoxyde d'azote N<sub>2</sub>O 100 %

rantième minute, et les leucocytes meurent à la quarantième minute, en « bubbling ». Jusqu'alors, ils avaient gardé une morphologie normale. En comparant cette courbe d'action du protoxyde d'azote 100 % avec la courbe de viabilité en anaérobie, on voit qu'elles ne sont pas superposables, car dans ce dernier cas, les leucocytes neutrophiles gardent une motilité normale jusqu'à la trentième minute.

Le protoxyde d'azote a donc une toxicité directe, à 100 % de concentration.

2. Si le protoxyde d'azote n'est pas pur, et en particulier lorsque l'on met en présence les PMN avec un mélange gazeux protoxyde d'azote - oxygène, les résultats sont assez disparates.

Il existe une dépression de la mobilité de 30 à 60 minutes, en présence d'un mélange gazeux consistant en :

- N<sub>2</sub>O 50 % ; O<sub>2</sub> 50 %,
- N<sub>2</sub>O 25 % ; O<sub>2</sub> 75 %.

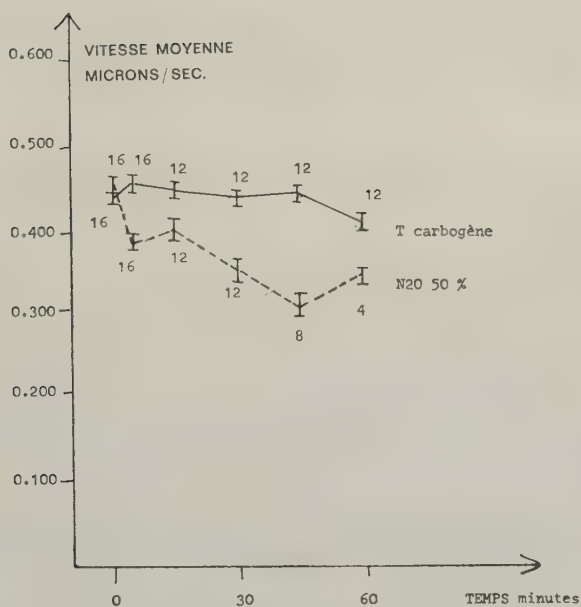


Fig. 31. — Carbogène + ou — protoxyde d'azote 50 %

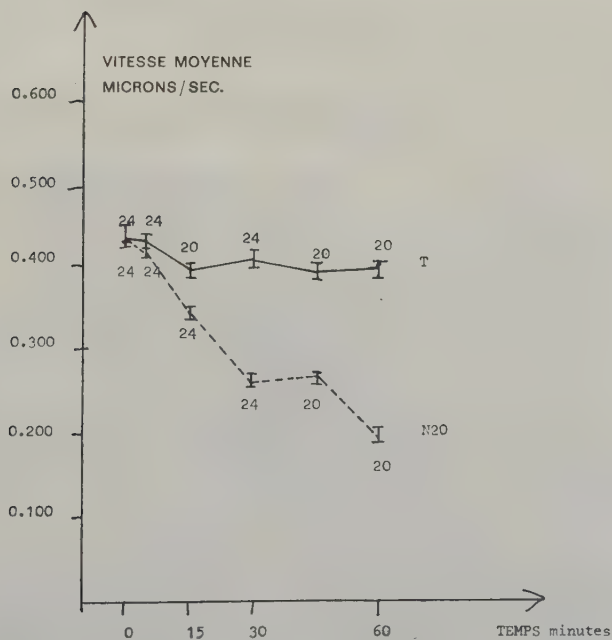


Fig. 32. — Carbogène + ou — protoxyde d'azote 25 %

Les figures 31 et 32 représentent les résultats obtenus, par rapport à un témoin en présence de carbogène, ils ne sont pas probants.

#### D — Action des anesthésiques halogénés : halothane et méthoxyflurane

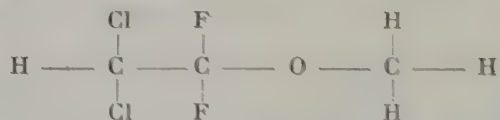
Seront successivement étudiés :

- la présentation de ces deux anesthésiques ;
- l'action du méthoxyflurane à diverses concentrations ;
- l'action de l'halothane à diverses concentrations, en présence d'un mélange gazeux standard, d'oxygène et d'AMP 3'5' cyclique ;
- l'essai d'interprétation de ces actions, en particulier la différence de ces deux gaz au niveau cellulaire ;
- la comparaison avec des résultats déjà trouvés par différents auteurs.

##### 1. PRÉSENTATION DE CES DEUX GAZ ANESTHÉSQUES HALOGÉNÉS EMPLOYÉS : MÉTHOXYFLURANE ET HALOTHANE.

a) *Le méthoxyflurane* (commercialisé en France sous le nom de Penthrane par les laboratoires Abbott).

C'est le 2,2 dichloro 1,1 difluoroéthyl-méthyl éther. Sa formule est la suivante :



Il se présente sous la forme d'un liquide clair, fruité, dans des flacons de verre teinté. Ses propriétés physiques sont les suivantes (Egel et Shagel en 1963) :

|                       |   |                                      |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| Poids moléculaire     | : | 145,9                                |
| Point d'ébullition    | : | 104° C                               |
| Point de vaporisation | : | 49 calories/gramme                   |
| Pression de vapeur    | : | 25 mm Hg à 22° C<br>60 mm Hg à 38° C |

|                            |   |                    |
|----------------------------|---|--------------------|
| Solubilité dans l'eau      | : | 1,95 g/l à 37° C   |
| Solubilité dans les huiles | : | toutes proportions |
| Coefficients de solubilité | : |                    |
| H <sub>2</sub> O/gaz       | : | 4,2                |
| sang/gaz                   | : | 13                 |
| huile/gaz                  | : | 825                |
| huile/H <sub>2</sub> O     | : | 400 à 37° C        |

Cet agent anesthésique entraîne en clinique humaine une narcose, une analgésie prolongée et qui peut être profonde et un relâchement musculaire modéré. Il diffuse lentement au niveau du Pentrec, vaporisateur de méthoxyflurane, par contre rapidement au niveau des circuits et des graisses.

Il peut se fixer sur les caoutchoucs des circuits et être libéré ultérieurement alors que le Pentrec est arrêté. Il attaque les caoutchoucs en polyéthylène et en polypropylène, d'où la nécessité d'utiliser des caoutchoucs en chlorure de vinyle, inattaquables.

L'appareil de vaporisation est le Pentrec (Fig. 33) avec trois graduations à 0,5 %, 1 %, 1,5 %. Le débit gazeux doit être suffisant pour que la concentration en méthoxyflurane soit constante. Elle est de plus fonction de la température ambiante.

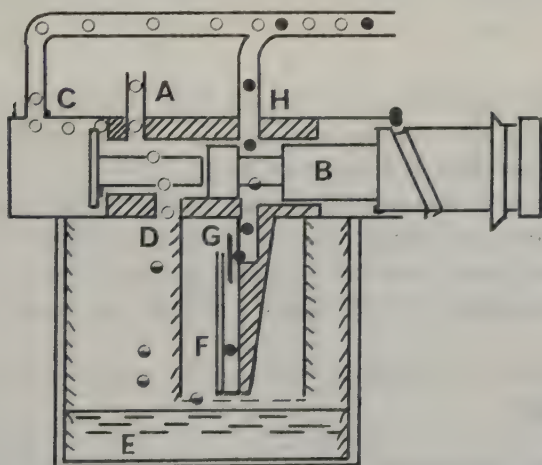
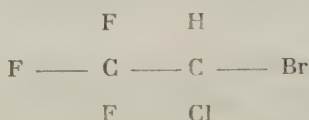


Fig. 33. — Schéma du Pentrec ou du Fluotec : le mélange gazeux passe en A, une partie est dirigée vers le by-pass C, l'autre partie pénètre dans la cuve D. Les gaz saturés passent par H vers la sortie

b) *L'halothane* (commercialisé en France sous le nom de Fluothane par les Laboratoires ICI - Pharma).

C'est le 2 bromo 2 chloro trifluoroéthane.

Sa formule est la suivante :



Ses constantes physiques sont les suivantes :

|                                     |   |                                  |
|-------------------------------------|---|----------------------------------|
| Poids moléculaire                   | : | 197.39                           |
| Point d'ébullition                  | : | 50,2° C                          |
| Point de vaporisation               | : | 35,2 calories/gramme             |
| Tension de vapeur                   | : | 243 mm Hg à 20° C                |
| Solubilité dans l'eau               | : | 0,345 %                          |
| Solubilité dans l'huile             | : | miscible dans toutes proportions |
| Coefficient de partage<br>huile/eau | : | 220                              |

C'est un hypnotique puissant, modérément analgésique et modérément myorelaxant, mais potentialisant les curaromimétiques.

Il est vaporisé par le Fluotec, décrit par Radiguet de la Bastaie en 1968 ; le schéma est analogue à celui du Pentrec (Fig. 33).

Le débit gazeux est là aussi fonction de la température ambiante, et n'est constant qu'à partir d'un certain débit/minute du gaz vecteur (6 à 8 litres par mn).

Nous reverrons certaines propriétés intéressantes de ces deux gaz dans le chapitre d'interprétation des résultats.

Ces gaz sont concentrés dans les cellules : 1/25 dans le cas de l'halothane, 1/400 dans le cas du méthoxyflurane.

## 2. ACTION DU MÉTHOXYFLURANE IN VITRO SUR LA MOTILITÉ LEUCOCYTAIRE.

Ce gaz a été utilisé à trois concentrations, utilisées en clinique humaine : 1,5 %, 1 %, 0,5 %.

Cette action est représentée par les figures 34, 35, 37, 38, 39, 40.

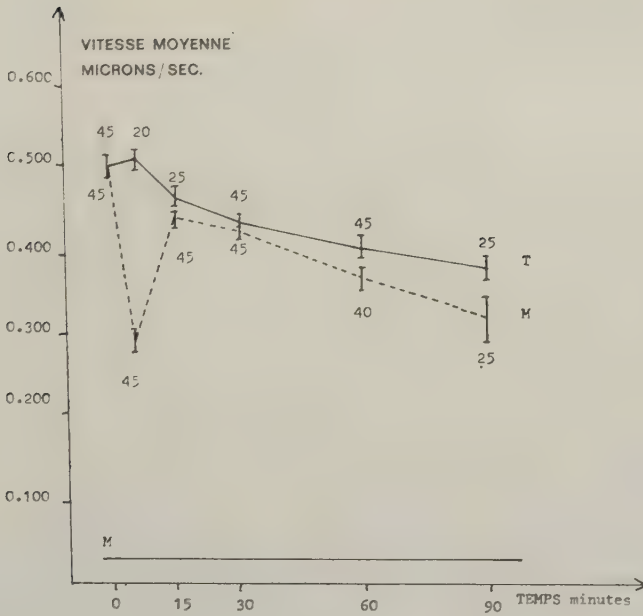


Fig. 34. — Action du méthoxyflurane 1,5 % dans le temps

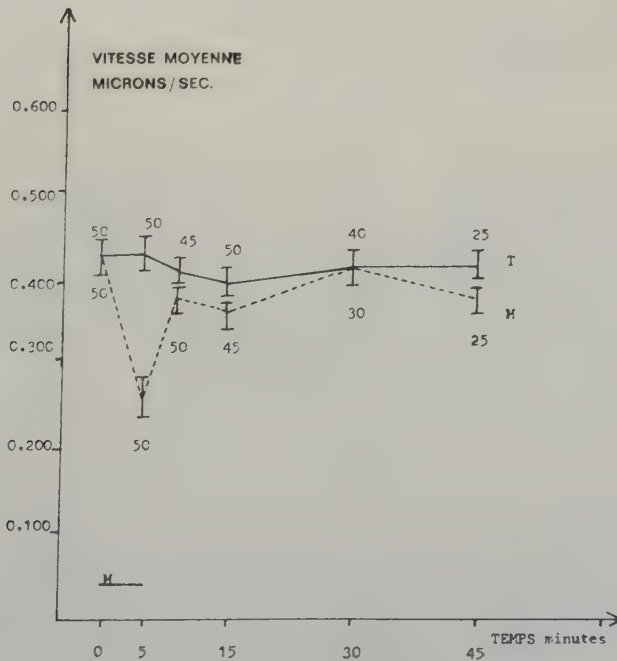


Fig. 35. — Dépression - réversion à 5 minutes  
Méthoxyflurane 1,5 %

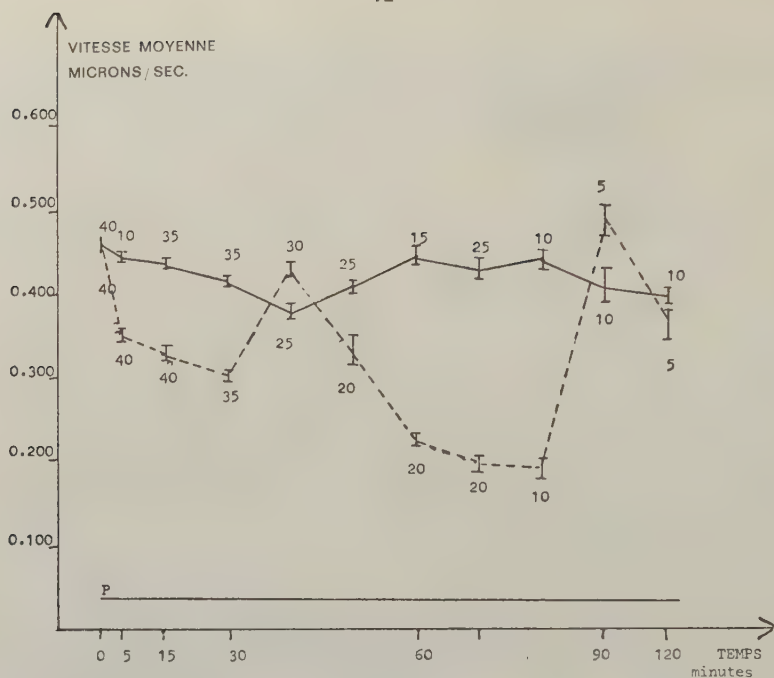


Fig. 36. — Action du méthoxyflurane 1 % dans le temps

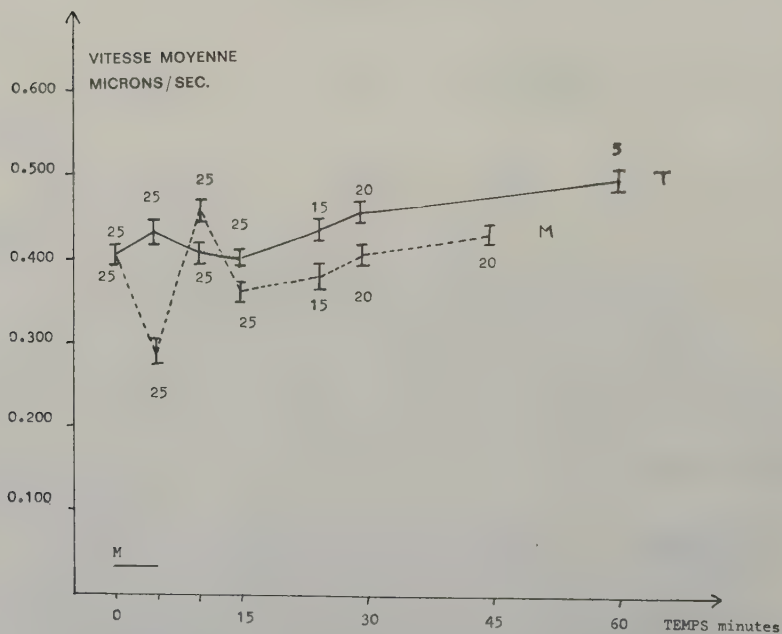


Fig. 37. — Dépression - réversion à 5 minutes  
Méthoxyflurane 1 %

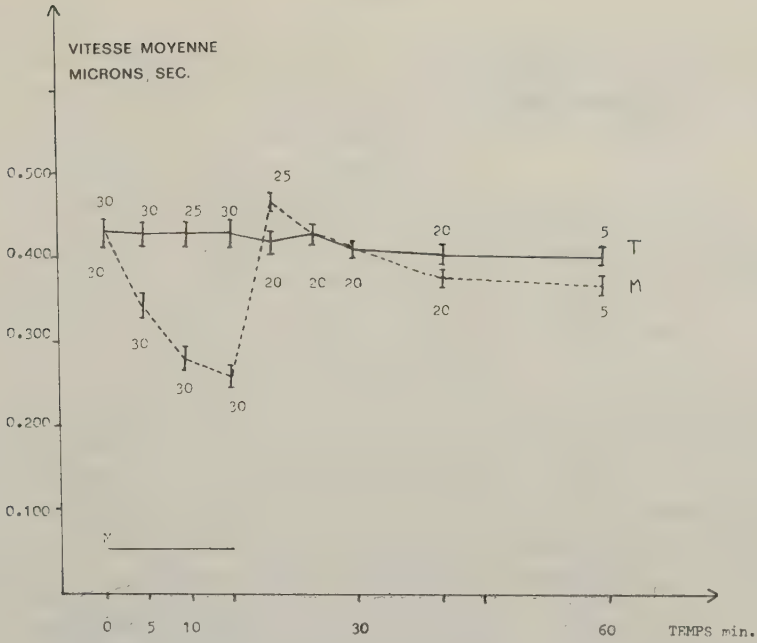


Fig. 38. — Action du méthoxyflurane 1 %. Réversion à 15 minutes

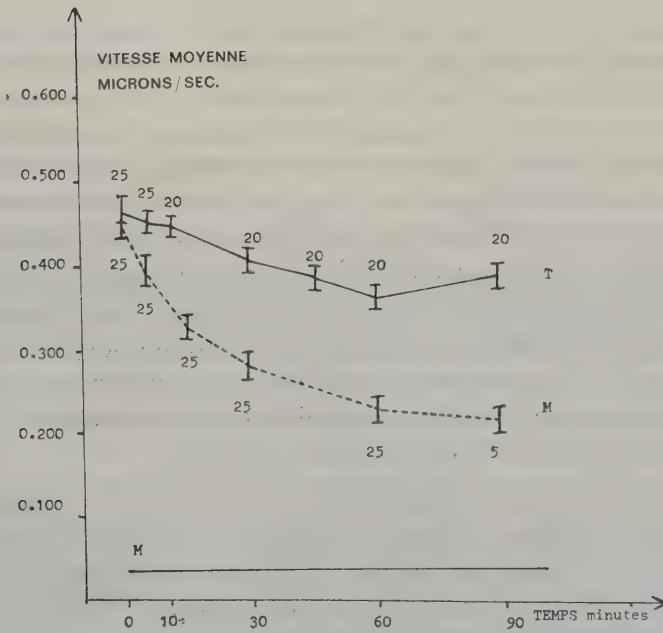


Fig. 39. — Action du méthoxyflurane 0,5 % dans le temps

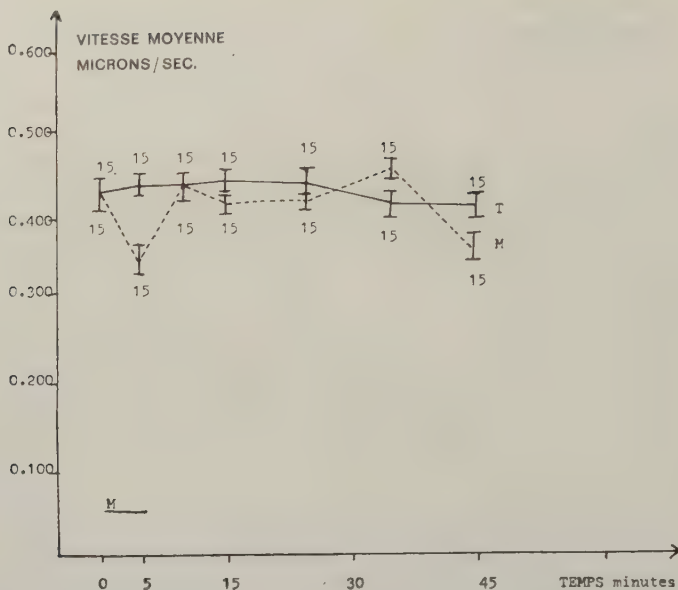


Fig. 40. — Dépression - réversion 5 minutes  
Méthoxyflurane 0,5 %

a) A 1,5 % (Fig. 34), il existe une dépression initiale à 5 minutes. La vitesse de reptation passe de 0,499 microns/sec. à 0,290 microns/sec. sur 45 échantillons, alors que la vitesse témoin reste constante au bout de 5 minutes. La différence est significative. Cette dépression est constante et reproductible. A 15 minutes, elle redevient dans les normes de vitesse, pour décroître de 15 à 90 minutes, où elle mesure 0,313 microns/sec.

La figure 35 représente la réversion obtenue en 5 minutes, lorsque l'on remplace à 5 minutes les vapeurs anesthésiques par une ambiance gazeuse témoin. Elle est fondamentalement différente de la courbe précédente, car la réversion est complète, la courbe suivant la courbe témoin de 5 à 45 minutes, et n'entamant pas de pente décroissante.

b) A 1 %, la courbe dans le temps est du même type (Fig. 36). La seule différence est que la dépression est moins marquée à 5 minutes qu'avec des concentrations plus fortes de méthoxyflurane, mais elle persiste durant 30 minutes, avant d'aller rejoindre la courbe témoin.

Une deuxième dépression se manifeste de 60 à 105 minutes, réversible elle aussi spontanément. Il existe une réversion complète à 5 et à 15 minutes lorsque l'on met les cellules en contact avec l'ambiance gazeuse témoin.

Les figures 37 et 38 représentent ces deux réversions.

La vitesse de reptation passe de 0,453 microns/sec. au temps 0 à 0,348 microns/sec. à 5 minutes. La dépression est moins marquée qu'avec 1,5 %, mais néanmoins significative.

c) A 0,5 %, la courbe d'action dans le temps n'a plus du tout la même forme que les deux précédentes : c'est une courbe à pente descendante sans qu'il y ait de réversion spontanée jusqu'à 90 minutes. A 5 minutes, la vitesse est de 0,390 microns/sec. (le témoin étant de 0,458 microns/sec.) ; à 90 minutes, elle n'est plus que de 0,219 microns/sec. (Fig. 29). Il existe aussi une réversion complète à 5 minutes lorsque l'on arrête le gaz anesthésique, comme le représente la figure 40.

d) *Au total*, nous y reviendrons :

— dépression initiale à 5 minutes, quelle que soit la concentration ;

— effet toxique direct modéré, à fortes concentrations ;

— la courbe dose-réponse sur l'effet de dépression à 5 minutes est une droite.

### 3. ACTION DE L'HALOTHANE IN VITRO EN CONTACT D'UN MÉLANGE GAZEUX STANDARD : CO<sub>2</sub> : 5 %, O<sub>2</sub> : 19 %, N<sub>2</sub> : 75 %.

L'action se résume en deux effets : dépresseur et toxique sur la motilité des polymorphonucléaires neutrophiles in vitro. Ces deux effets sont plus ou moins marqués suivant la concentration.

a) A 4 % (Fig. 41), la vitesse de départ est significativement identique des vitesses moyennes standard étudiées sur un grand nombre de cellules. Elle décroît en 5 minutes à 0,162 microns/sec., plus ou moins 0,012 (écarts-types), alors que le témoin comparatif garde une vitesse constante, qui est de 0,408 microns/sec. Les cellules passent ensuite par une phase d'excitation au temps 15 minutes (la vitesse est alors de 0,548 microns/sec.) ; elles ont des mouvements anarchiques,

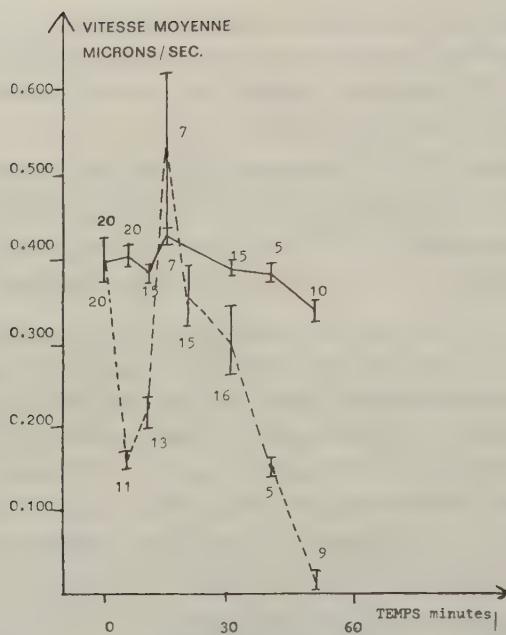


Fig. 41. — Action de l'halothane 4 % dans le temps

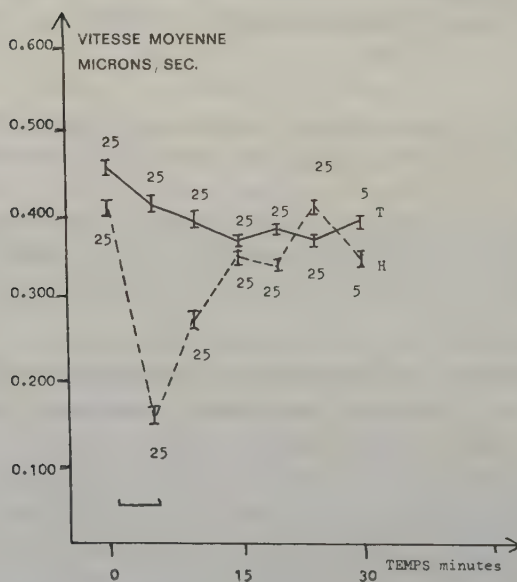


Fig. 42. — Halothane 4 %. Réversion à 5 minutes

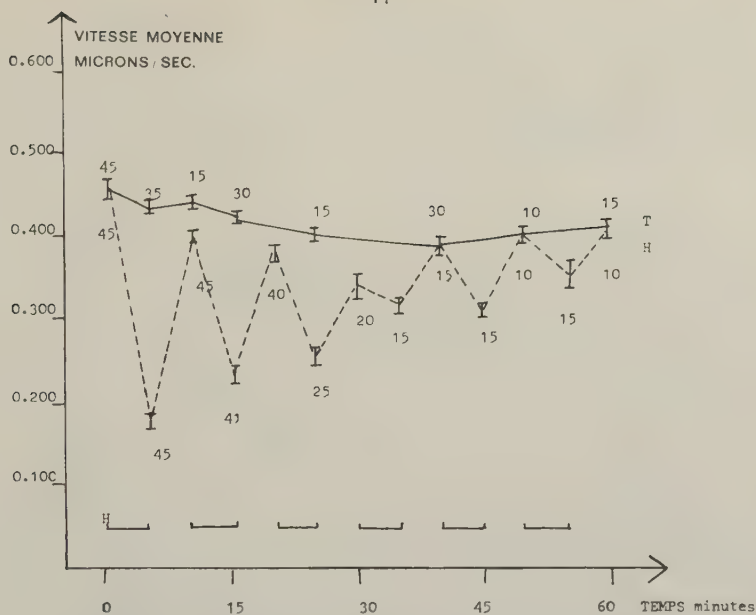


Fig. 43. — Dépressions - réversions répétées à 5 minutes dans le temps. Halothane 4 %

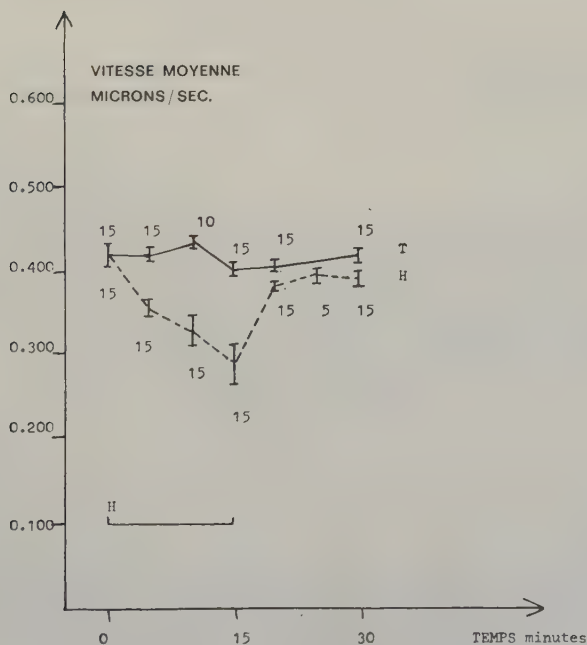


Fig. 44. — Action de l'halothane 3 % dans le temps

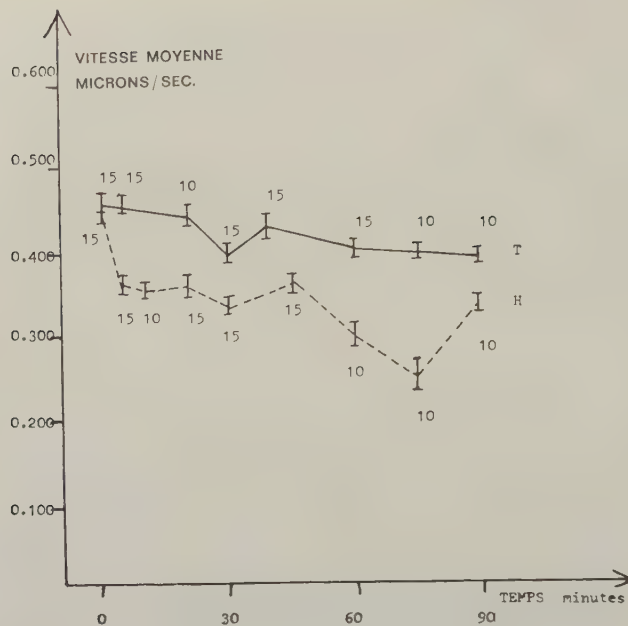


Fig. 45. — Réversion à 15 minutes. Halothane 3 %

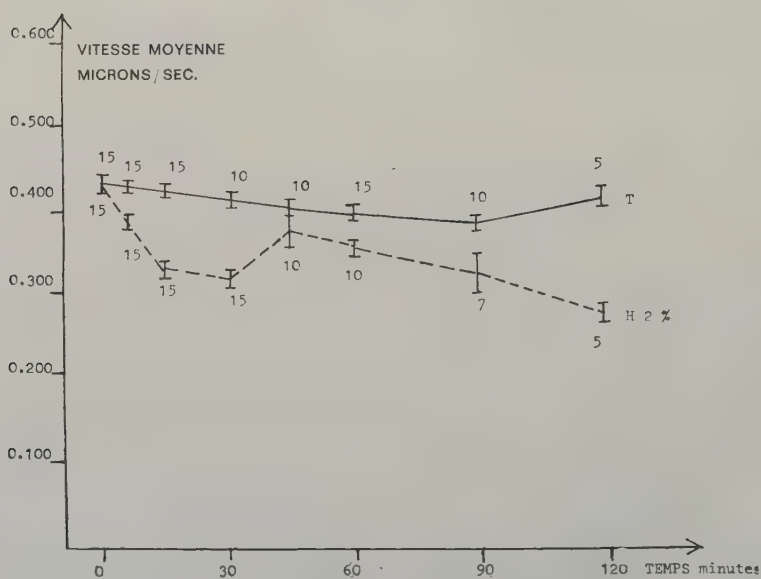


Fig. 46. — Halothane 2 % dans le temps

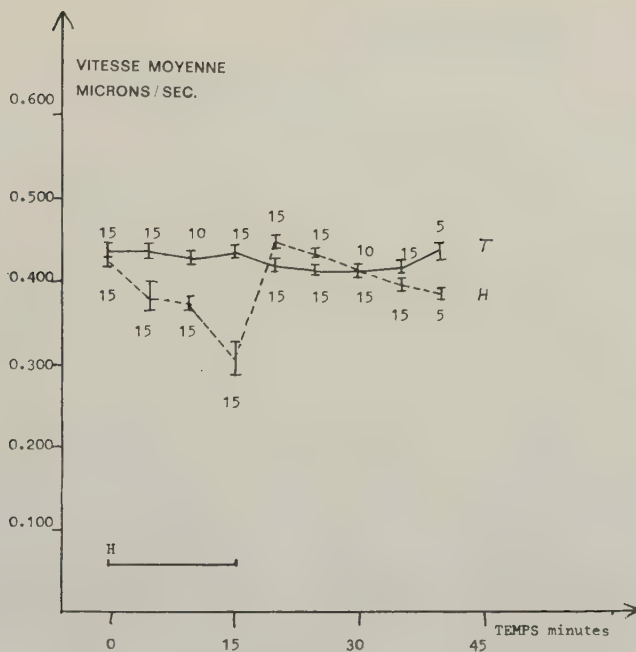


Fig. 47. — Halothane 2 %. Réversion à 15 minutes

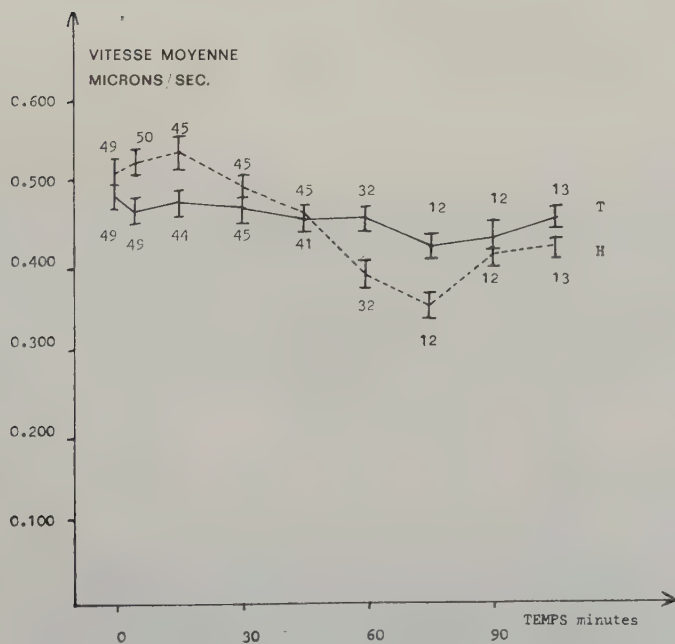


Fig. 48. — Action de l'halothane 4 % dans le temps sur la vitesse des PMN prélevés sur sang complet

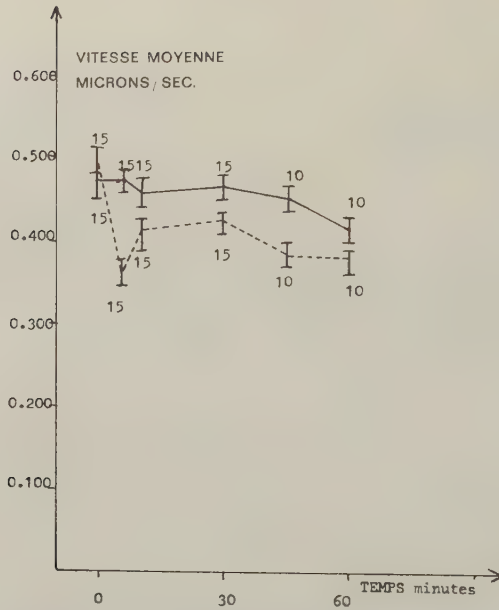


Fig. 49. — Action de l'halothane 4 % sur la vitesse leucocytaire  
Sang dilué au 1/4

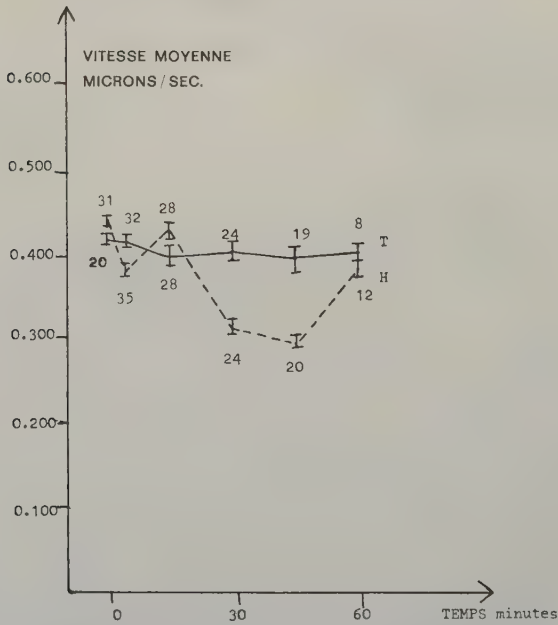


Fig. 50. — Action de l'halothane 4 % et du carbogène  
sur la vitesse des PMN en suspension

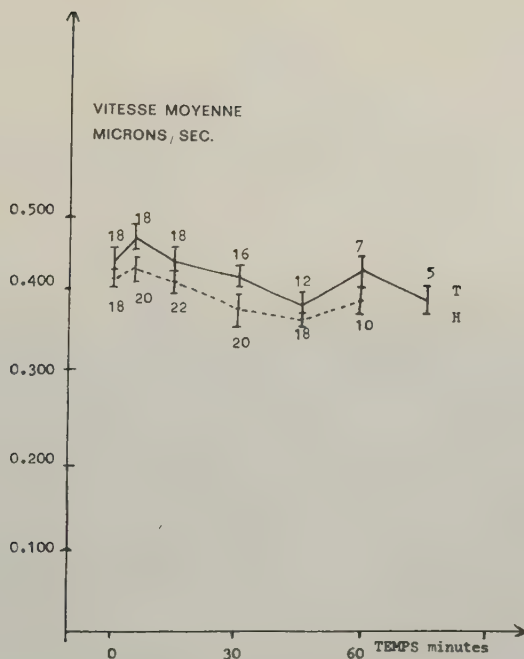


Fig. 51. — Action de l'halothane 4 % sur une suspension leucocytaire en présence d'AMP 3'5' non dibutyrylé

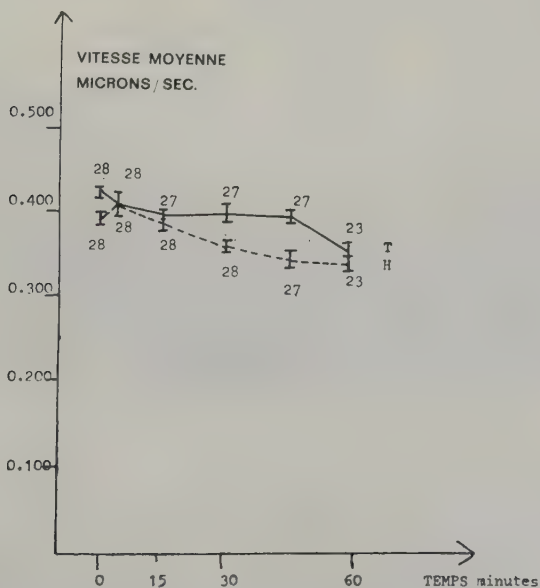
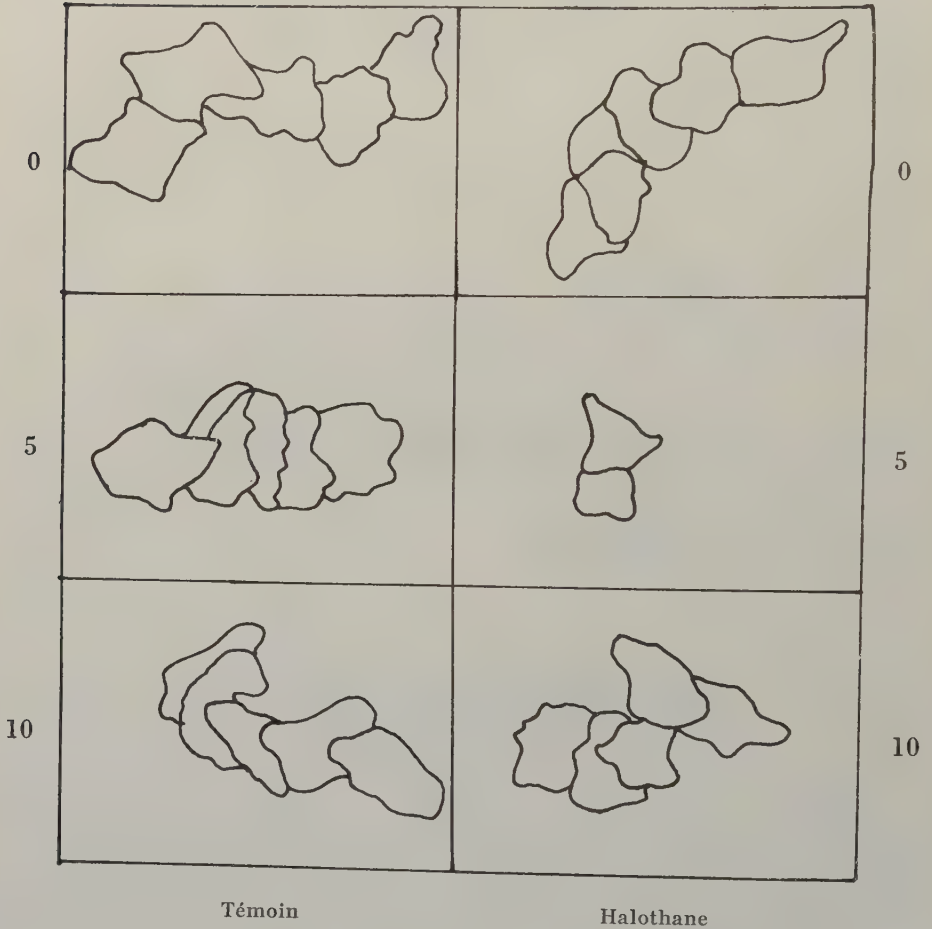


Fig. 52. — Action de l'halothane 4 % et de l'AMP 3'5' cyclique dibutyrylé sur la vitesse des PMN

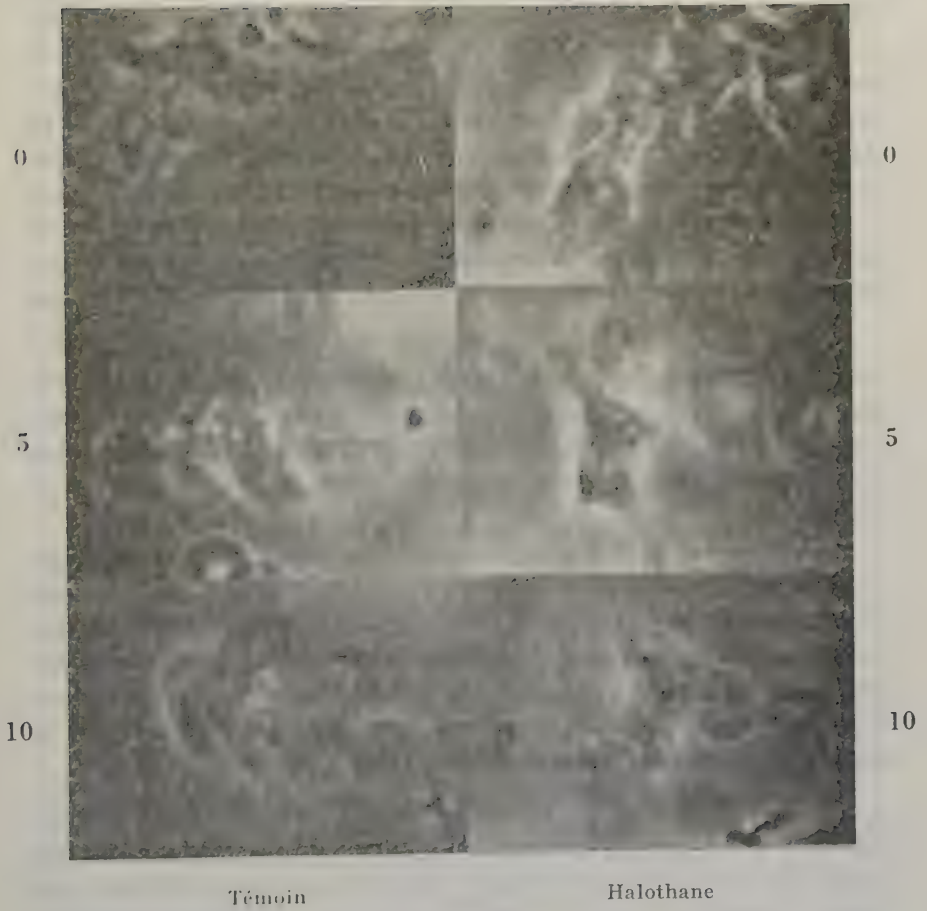
PLANCHE I

Visualisation de l'action de l'halothane à 4 % sur la vitesse  
leucocytaire à 5 min. avec réversion



*Sur calque*

PLANCHE II



*Sur photopolaroïd*

changent de nombreuses fois de direction (Planches I et II). Cette phase est suivie d'une dernière phase de dépression prémortem, jusqu'à 50 minutes environ ; puis les cellules meurent en « bubbling ». Cette dernière phase est irréversible.

La première dépression est par contre réversible en 5 minutes, c'est-à-dire que si à 5 minutes on coupe l'arrivée d'halothane dans le circuit et si l'on met en contact les cellules avec un mélange gazeux témoin, la vitesse des leucocytes devient alors identique au témoin à la quinzième minute, comme le montre la figure 42. Cette réversion peut être répétée (Fig. 43), et il existe un phénomène d'épuisement de l'effet ou tachyphylaxie. En effet, en répétant 3 fois l'expérience, la dépression est significative ; mais si on la répète plus de trois fois, l'effet de dépression s'estompe rapidement. Les cellules « s'habituent » en quelque sorte au gaz anesthésique. Cette réversion à 5 minutes est complète, et ne laisse plus de traces puisque la courbe suit la courbe témoin au bout de 15 minutes.

b) A 3 %, l'action de l'halothane est dans le temps, observée durant une heure et demie, est telle que la courbe d'ensemble est décroissante (Fig. 44). Il existe deux vitesses minimales : à 25 minutes (0,341 microns/sec.) et à 75 minutes (0,254 microns/sec.). Il n'y a pas de phase d'excitation, comme à 4 %.

La dépression à 5 minutes n'est pas très significative, dans l'ensemble des expériences ; elle l'est plus à 15 et 20 minutes. Nous verrons mieux ce phénomène plus loin, en analysant les courbes semi-logarithmiques dose - réponse. La réversion est complète à 15 minutes, comme le montre la figure 45. La vitesse à 15 minutes est de 0,281 microns/sec. Cette réversibilité est là aussi reproductible plusieurs fois, mais épuisable.

c) A 2 %, l'effet des vapeurs d'halothane est encore moins marqué qu'à 3 %. Il existe dans l'ensemble une dépression continue mais peu importante (la pente de décroissance est faible) jusqu'à 2 h. en 30 mn (Fig. 46). A 5 minutes, la différence de vitesse avec le témoin n'est pas significative. Elle ne l'est pas non plus à 15 minutes, comme le représente la figure 47. Tous ces résultats sont obtenus en étudiant une suspension leucocytaire dans le plasma. Ils sont différents lorsque l'on étudie cette action sur sang complet.

d) *Action de l'halothane à 4 % sur sang complet* : Lorsque l'on met en présence, dans les mêmes conditions que précédemment, des vapeurs d'halothane et du sang complet, la vitesse de reptation des leucocytes neutrophiles n'est pas influencée par ce gaz, concentré à 4 %, et à 37° C.

La présence d'hématies dans le milieu empêche l'action dépressive de l'halothane. La figure 48 montre ces résultats. A 5 minutes, la vitesse est de 0,527 microns/sec., le témoin étant à 0,474 microns/sec.

Si l'on diminue le pourcentage d'hématies dans le milieu, la dépression initiale est présente, mais moins importante. La figure 49 montre l'influence de ce gaz lorsque le sang est dilué au 1/4 dans son propre plasma.

Pour que ces expériences soient faites dans des conditions standard, on maintient la concentration d'hémoglobine, d'une expérience à l'autre, en l'évaluant à l'aide d'un spectrophotomètre.

Il existe donc à 5 minutes une dépression significative, mais moins intense que lorsqu'il s'agit d'une suspension leucocytaire, séparée par gravité. Au total, la dépression à 5 minutes est à :

- 0,161 microns/sec. (T : 0,408)  
pour la suspension, soit 39,5 %,
- 0,362 microns/sec. (T : 0,471)  
pour le sang dilué au 1/4, soit 76,9 %,
- 0,527 microns/sec. (T : 0,474)  
pour le sang complet, soit 111,2 %.

La courbe dose - réponse de la vitesse en fonction de la concentration en hémoglobine est une exponentielle très plate ; pratiquement, elle peut être assimilée à une droite. Il existe donc une relation entre l'action initiale de dépression à 5 minutes et la concentration en hémoglobine dans le milieu, étant présente dans les hématies.

e) *Action de l'halothane 4 % sur une suspension de polymorphonucléaires neutrophiles dans une ambiance gazeuse oxygénée (carbogène)* : Elle est représentée par la figure 50. Elle est nulle précocement. Il n'y a pas de différence significative entre la vitesse sous halothane (0,395 microns/sec.) et la vitesse

témoin (0,413 microns/sec.), à 5 minutes. Par contre, il existe une dépression de 30 à 45 minutes, spontanément réversible, maximale à 45 minutes, où la vitesse n'est plus que 0,303 microns/sec., pour une vitesse témoin de 0,393 microns/sec. La dépression est donc retardée et modérée.

f) *En remplaçant l'oxygène par une source énergétique chimique*, telle l'adénosine monophosphate 3'5' cyclique, à la dose de  $5 \cdot 10^{-3}$  Molaire, on constate qu'en présence d'AMP 3'5' cyclique, dibutirylé ou non — le dérivé dibutirylé est connu pour son passage plus facile à l'intérieur de la cellule —, il n'y a pas de dépression, ni initiale, ni tardive, la vitesse suivant la courbe des vitesses témoins (Fig. 51 et 52).

#### 4. INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS.

a) Les gaz anesthésiques sont utilisés dans cette étude à des concentrations physiologiques et non physiologiques :

— la concentration anesthésique du méthoxyflurane est de 40 mg/100 ml dans le sang ;

— la concentration de l'halothane de 40 mg/100 ml de plasma correspondent dans nos conditions expérimentales à 2 % de débit gazeux au Fluotec ; à 4 %, la concentration est de 80 mg/ml de plasma.

b) L'action de ces deux gaz est caractérisée par deux phases :

— la phase de dépression initiale, réversible spontanément de façon incomplète, et complètement après arrêt du gaz anesthésique ;

— la phase toxique, qui entraîne dans le cas de l'halothane à 4 % une mort cellulaire à 50 minutes.

La phase de dépression initiale est la plus intéressante. On ne la retrouve pas dans le cas des autres anesthésiques comme l'éther, le chloroforme et le protoxyde d'azote.

Elle survient à 5, 10, 15 ou 20 minutes suivant le gaz et la concentration. Des courbes dose - réponse ont été tracées en fonction de la dépression à 5 minutes à diverses concentrations. Elles sont représentées sur les figures 53 et 54. Les tableaux VIII et IX expliquent les différents calculs.

TABLEAU VIII

*Courbe dose-réponse de l'action du méthoxyflurane sur la motilité leucocytaire*

|                 | Témoin<br>au temps 0 | Méthoxy-<br>flurane<br>au temps 0 | Témoin<br>au temps 5 | Méthoxy-<br>flurane<br>au temps 5 |
|-----------------|----------------------|-----------------------------------|----------------------|-----------------------------------|
| M 1,5 %         |                      |                                   |                      |                                   |
| Vitesse moyenne | 0,463                | 0,461                             | 0,446                | 0,227                             |
| Ecart-type      | 0,006                | 0,005                             | 0,008                | 0,006                             |
| Echantillons    | 95                   | 95                                | 70                   | 95                                |
| M 1 %           |                      |                                   |                      |                                   |
| Vitesse moyenne | 0,434                | 0,429                             | 0,429                | 0,334                             |
| Ecart-type      | 0,005                | 0,009                             | 0,007                | 0,006                             |
| Echantillons    | 95                   | 95                                | 65                   | 95                                |
| M 0,5 %         |                      |                                   |                      |                                   |
| Vitesse moyenne | 0,459                | 0,460                             | 0,446                | 0,373                             |
| Ecart-type      | 0,008                | 0,007                             | 0,007                | 0,008                             |
| Echantillons    | 40                   | 40                                | 40                   | 40                                |

soit témoin : vitesse moyenne : 0,447  $\mu$ /sec. sur 635 échantillons  
et sur la courbe dose-réponse :

|                                                 | M 1,5 % | M 1 %   | M 0,5 % |
|-------------------------------------------------|---------|---------|---------|
| Abscisse :                                      |         |         |         |
| logarithme de la<br>concentration en M          | — 1,824 | — 2,000 | — 2,505 |
| Ordonnée :                                      |         |         |         |
| % de la vitesse<br>obtenue : par rapport<br>à T | 59,87 % | 77,85 % | 81,09 % |

TABLEAU IX

*Courbe dose-réponse de l'action de l'halothane sur la vitesse leucocytaire*

|                 | Témoin<br>au temps 0 | Halothane<br>au temps 0 | Témoin<br>au temps<br>5 min. | Halothane<br>au temps<br>5 min. |
|-----------------|----------------------|-------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| H 2 %           |                      |                         |                              |                                 |
| Vitesse moyenne | 0,373                | 0,376                   | 0,392                        | 0,147                           |
| Ecart-type      | 0,007                | 0,007                   | 0,006                        | 0,009                           |
| Echantillons    | 125                  | 95                      | 105                          | 111                             |
| H 4 %           |                      |                         |                              |                                 |
| Vitesse moyenne | 0,441                | 0,439                   | 0,437                        | 0,367                           |
| Ecart-type      | 0,008                | 0,006                   | 0,008                        | 0,011                           |
| Echantillons    | 45                   | 45                      | 45                           | 45                              |
| H 3 %           |                      |                         |                              |                                 |
| Vitesse moyenne | 0,438                | 0,435                   | 0,427                        | 0,382                           |
| Ecart-type      | 0,012                | 0,007                   | 0,009                        | 0,012                           |
| Echantillons    | 25                   | 47                      | 54                           | 49                              |

soit, pour le témoin, une vitesse moyenne de 0,418 microns/seconde, pour 691 échantillons.

Ces résultats sont convertis sur la courbe dose-réponse :

|                                               | H 4 %   | H 3 %   | H 2 %   |
|-----------------------------------------------|---------|---------|---------|
| Abscisse :                                    |         |         |         |
| logarithme de la<br>concentration en H        | — 3,216 | — 3,506 | — 3,912 |
| Ordonnée :                                    |         |         |         |
| % de la vitesse<br>obtenue par rapport<br>à T | 35,21 % | 87,89 % | 91,49 % |

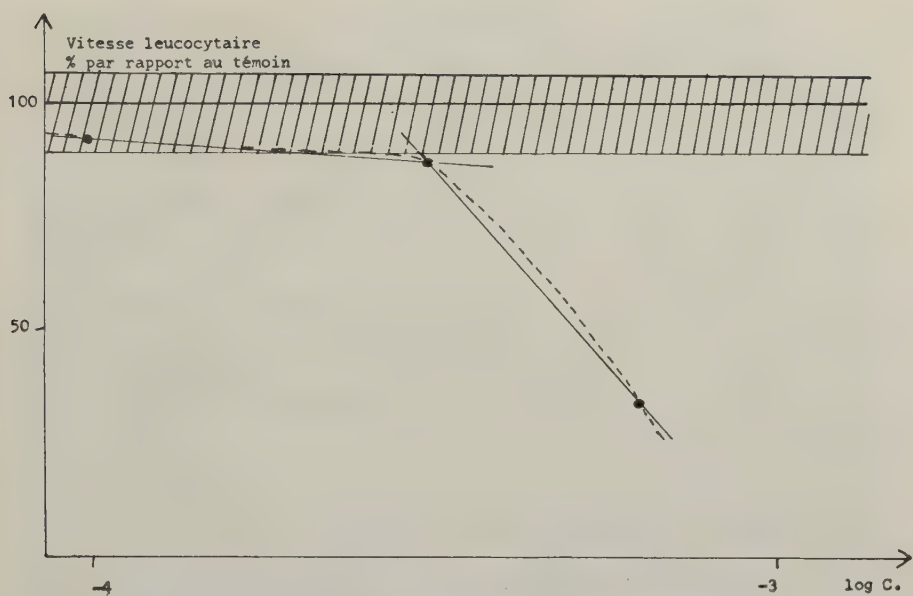


Fig. 53. — Courbe dose-réponse : dépression à 5 minutes  
par le méthoxyflurane

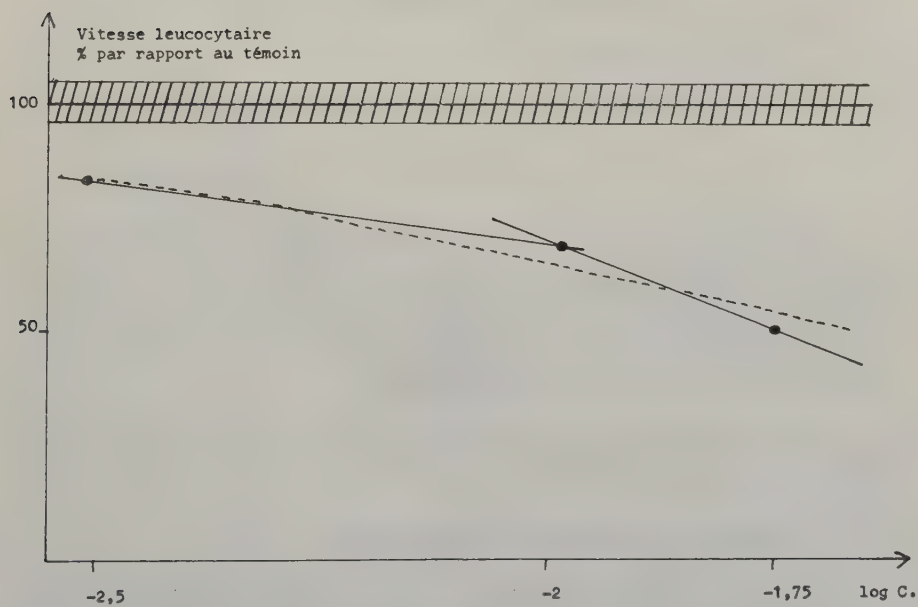


Fig. 54. — Courbe dose-réponse : dépression à 5 minutes  
par l'halothane

Les figures 53 et 54 sont des courbes semi-logarithmiques, où l'abscisse est représentée par le logarithme de la concentration de ce gaz et où l'ordonnée par l'effet, en l'occurrence la dépression à 5 minutes exprimée non en unités de vitesse, mais en pourcentage par rapport au témoin.

Les deux courbes sont différentes, selon qu'il s'agit du méthoxyflurane et de l'halothane. Dans le premier cas, il s'agit d'une exponentielle très étalée, tendant lentement vers les valeurs témoins ; dans le second cas, il existe une cassure nette de l'exponentielle à la concentration de 3 %, c'est-à-dire à 60 mg/100 ml. Ceci signifie qu'à 2 % et 3 %, l'halothane n'agit quasiment pas sur la vitesse des leucocytes, alors qu'à 1 % le méthoxyflurane est encore actif.

Par ailleurs, si l'on considère dans le temps l'action de dépression de ces deux gaz, on remarque :

— *Pour le méthoxyflurane :*

- à 5 minutes, une dépression de 40,13 % (M 1,5 %),
- à 5 minutes, une dépression de 22,15 % (M 1 %),
- à 5 minutes, une dépression de 19,9 % (M 0,5 %).

— *Pour l'halothane :*

- à 5 minutes, une dépression de 64,79 % (H 4 %),
- à 20 minutes, une dépression de 21,69 % (H 3 %),
- à 30 minutes, une dépression de 8,20 % (H 2 %).

Dans ce cas, tenant compte de ces chiffres, la courbe dose-réponse pour l'halothane a tendance à devenir une exponentielle beaucoup plus étalée. Ceci peut signifier que le mode d'action cellulaire ou l'accumulation intracellulaire ou membranaire de ces deux gaz sont différents.

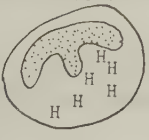
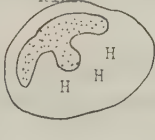
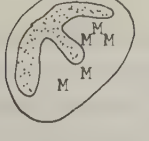
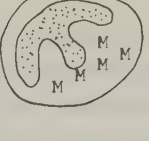
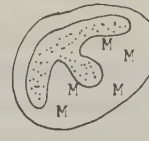
Deux hypothèses peuvent être faites : elles sont représentées sur les deux schémas suivants :

1. PREMIÈRE HYPOTHÈSE (Tableau X) :

Il faut que les molécules des deux anesthésiques pénètrent à l'intérieur de la cellule pour être actives, et si dans le cas du méthoxyflurane la dépression est en rapport avec le nombre

TABLEAU X

Première hypothèse : accumulation intracellulaire

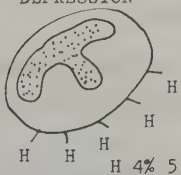
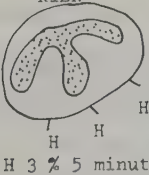
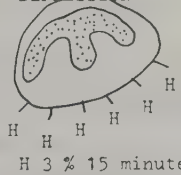
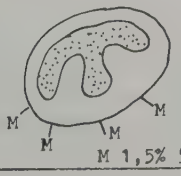
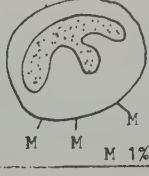
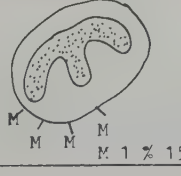
|           |                                                                                                                              |                                                                                                                            |                                                                                                                             |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HALOTHANE | <p>DEPRESSION</p>  <p>H 4 % 5 minutes</p>   | <p>RIEN</p>  <p>H 3 % 5 minutes</p>       | <p>DEPRESSION</p>  <p>H 3 % 15 minutes</p> |
|           | <p>DEPRESSION</p>  <p>M 1,5 % 5 minutes</p> | <p>dépression</p>  <p>M 1 % 5 minutes</p> | <p>DEPRESSION</p>  <p>M 1 % 15 minutes</p> |

de molécules intracellulaires, dans le cas de l'halothane, il faut qu'il y ait un certain nombre de molécules dans la cellule, avant qu'il n'y ait une action significative. Ce gaz est donc actif soit lorsque l'on amène une grande concentration — il est, nous le savons, très diffusible dans les cellules —, soit lorsqu'il s'accumule dans le temps.

## 2. DEUXIÈME HYPOTHÈSE (Tableau XI) :

TABLEAU XI

Deuxième hypothèse : action sur les récepteurs membranaires

|           |                                                                                                                             |                                                                                                                           |                                                                                                                               |
|-----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| HALOTHANE | <p>DEPRESSION</p>  <p>H 4 % 5 min.</p>   | <p>RIEN</p>  <p>H 3 % 5 minutes</p>    | <p>DEPRESSION</p>  <p>H 3 % 15 minutes</p> |
|           | <p>DEPRESSION</p>  <p>M 1,5 % 5 min.</p> | <p>DEPRESSION</p>  <p>M 1 % 5 min.</p> | <p>DEPRESSION</p>  <p>M 1 % 15 min.</p>    |

Il s'agit de sites d'action membranaires, et ce nombre de sites est proportionnel à la concentration amenée ou à l'accumulation dans le temps dans le cas de l'halothane. Il est nécessaire qu'un certain nombre de sites soient occupés pour que l'action soit effective.

Dans le cas du méthoxyflurane, le nombre de sites occupés ne doit avoir une importance que pour l'intensité de la dépression.

### 3. AUTRES HYPOTHÈSES :

Aronson, en 1967, a montré que l'halothane diminue la viscosité plasmatique, alors que le méthoxyflurane ne la change pas. La diminution de la viscosité ne pourrait qu'augmenter la vitesse leucocytaire, comme nous l'avons vu plus haut, et ne peut en aucun cas expliquer cette dépression initiale.

De toute façon, la participation d'un facteur physique simple dans cette action des gaz halogénés est peu probable du fait de la réversibilité spontanée.

*Le calcul des Q 10 en fonction des concentrations anesthésiques (cf. plus haut : le facteur température est remplacé par le facteur concentration) retrouve des réactions d'ordre 1 en général, en dehors de réactions plus accélérées, lors du passage du :*

- méthoxyflurane de 1 % à 1,5 % où il est supérieur à 2 ;
- halothane de 3 % à 4 % où il est aussi supérieur à 2.

Le tableau XII montre les résultats obtenus.

Q 10 des anesthésiques halogénés : méthoxyflurane et halothane à propos de leur action sur la mobilité leucocytaire.

$$Q\ 10 = \frac{\log V\ 1 - \log V\ 2}{C\ 1 - C\ 2} \times 1\ (100\ \% \text{ de concentration})$$

TABLEAU XII

1. Méthoxyflurane

| 1,5 % | 1 %  | 0,5 % | T |
|-------|------|-------|---|
| 2,16  |      |       |   |
| 1,6   |      |       |   |
|       | 1,24 |       |   |
|       | 1,34 |       |   |
|       |      | 1,43  |   |

2. Halothane

| 4 %  | 3 %  | 2 %  | T |
|------|------|------|---|
| 2,49 |      |      |   |
| 1,31 |      |      |   |
|      | 1,04 |      |   |
|      | 1,06 |      |   |
|      |      | 1,07 |   |

Donc les Q 10 peuvent être assimilés à 1 pour les relations intermédiaires avec le témoin de ces deux anesthésiques, à l'exception de :

H 4 % à H 3 % : 2,49,

M 1,5 % à M 1 % : 2,16, qui sont donc des réactions nettement accélérées (pentes deux fois plus importantes).

5. TRAVAUX ANTÉRIEURS :

On retrouve le même type d'action des anesthésiques gazeux dans des travaux antérieurs concernant l'action de ces anesthésiques au niveau cellulaire, sur les bactéries, en microscopie optique et électronique, et sur des données biochimiques.

a) Barry et coll., en 1964, retrouvent une action antibactérienne de certains anesthésiques volatils. L'halothane a une action antibactérienne en phase liquide, par contact direct, en 6 minutes sur le staphylocoque pathogène, en 10 minutes sur le pyocyanique et sur le colibacille. Le méthoxyflurane, en

phase liquide, n'a pas d'activité antibactérienne après 15 minutes de contact direct avec le staphylocoque doré ni avec le pyocyanique. Il est bactériostatique sur le colibacille après 10 minutes de contact. Le tableau XIII montre les résultats obtenus :

TABLEAU XIII

| Sous cult.<br>faites ap.<br>contact de | Halothane     |       |      | Méthoxyflurane |       |      | Ether         |       |      | staf.<br>doré<br>doré |
|----------------------------------------|---------------|-------|------|----------------|-------|------|---------------|-------|------|-----------------------|
|                                        | staf.<br>doré | coli. | pyo. | staf.<br>doré  | coli. | pyo. | staf.<br>doré | coli. | pyo. |                       |
| 2 mn                                   | +             | +     | +    | +              | +     | +    | +             | +     | +    | +                     |
| 4 mn                                   | +             | +     | +    | +              | +     | +    | +             | +     | +    | +                     |
| 5 mn                                   | +             | +     | +    | +              | +     | +    | +             | +     | +    | +                     |
| 6 mn                                   | —             | +     | +    | +              | +     | +    | +             | +     | +    | +                     |
| 10 mn                                  | —             | —     | —    | +              | —     | +    | +             | +     | +    | légèr <sup>+</sup>    |
| 15 mn                                  | —             | —     | —    | +              | —     | +    | +             | +     | +    | +                     |
| 60 mn                                  |               |       |      | non faites     |       |      | +             | —     | —    | —                     |

b) Andersen, en 1969, remarque que les anesthésiques halogénés diminuent globalement *la division cellulaire*, sans pouvoir préciser le stade auquel ils agissent, en situant l'action probablement membranaire.

Bruce, en 1969, retrouve au niveau des cellules intestinales de rat avec des études isotopiques, avec de la thymidine tritiée, un retard de la synthèse de l'ADN.

c) *L'action de ces gaz sur la réponse immunitaire et sur les cellules sanguines a aussi été étudiée.*

Elle est consignée sur un article-revue de Bruce en 1971.

#### *Tout d'abord, action sur la mobilité cellulaire :*

En 1967, Bruce a montré par l'intermédiaire de la chambre de Boyden, chez la souris, que l'halothane inhibe la mobilisation des leucocytes et la phagocytose.

Plus tard, Nunn en 1870 a observé *in vitro* l'action de l'halothane sur les lymphocytes en culture, à 37° C. Après exposition à 2 % d'halothane, dans une chambre d'observation, il note sur 100 lymphocytes ayant une vitesse moyenne de 3,7 millimicrons, minute, après une heure d'exposition, une

décroissance de la vitesse à 0,6 millimicrons/minute significative ( $P$  inférieur à 0,001). Après arrêt de l'halothane, certaines cellules retrouvent immédiatement leur vitesse de départ, alors que les autres sont immobiles, dans une proportion non précisée. Nous verrons plus loin quelle interprétation microscopique il a donné à cette action.

*L'action sur la phagocytose* est elle aussi à type de dépression. Elle a été étudiée par Bruce, en 1967 ; il s'agit d'une inhibition de la phagocytose, retrouvée chez l'homme, la souris et le lapin. L'explication de cette action semble être par action directe au niveau de l'agent de la phagocytose. Il peut aussi y avoir une diminution de l'activité des opsonines. En 1966, il démontre que la diminution de l'extravasation des PMN par l'halothane est rapidement réversible lorsqu'on arrête l'anesthésique, *in vivo*.

En 1969, Humphrey remarque qu'il existe, *in vivo*, une diminution significative des cellules spléniques, productrices d'anticorps, mais 24 à 48 heures après une exposition continue à l'halothane ou au protoxyde d'azote à des doses anesthésiques, mais pas avant.

L'inhibition de la phagocytose et de la motilité leucocytaire et de la mobilisation à l'intérieur de l'organisme est plus difficile à apprécier du fait de facteurs humoraux associés. Par exemple, on note que l'halothane et l'éther modifient le premier stade du « stress », marqué par une augmentation du taux de neutrophiles et de lymphocytes. Les catécholamines circulantes semblent jouer un rôle (Humphrey en 1970).

De nombreuses expériences ont été effectuées pour étudier *l'action des anesthésiques sur l'anaphylaxie et la transplantation de greffes* : nous citerons Fagraens en 1948, Bruce et coll. en 1969. Dans l'ensemble, l'halothane à long terme a tendance à déprimer toute sorte de réponse immunitaire, ce qui le rend intéressant dans le cas d'anesthésies longues pour greffe d'organes ou en cours d'infection. Il ne semble pas par contre qu'il le fasse à court terme.

Des tests de transformation lymphoblastique en présence d'halothane, et chez des singes sensibilisés à l'halothane, ne retrouvent pas de pouvoir mutagène, ni sensibilisant (Bruce en 1972).

d) *Au total, dans l'ensemble des expériences, on retrouve :*

— une action à court et à long terme à type de dépression de la vitesse de reptation cellulaire, des leucocytes et des lymphocytes ;

— une réversion dès l'arrêt du courant gazeux sauf à la phase toxique ;

— une action plus générale de ces deux gaz : méthoxy-flurane, et surtout halothane, de dépression de la synthèse protéique au niveau des cellules et des bactéries, et à long terme une diminution de la réponse immunitaire.

Il est possible que la mobilité des leucocytes neutrophiles puisse entrer dans la batterie des tests explorant l'immunité cellulaire. Seules, des expériences comparatives avec des tests connus et la comparaison des résultats pourront le confirmer.

#### 6. MÉCANISME CELLULAIRE DE L'ACTION DES GAZ HALOGÉNÉS :

En ce qui concerne le mécanisme cellulaire de l'action de ces gaz, divers travaux ont tenté de l'élucider :

Nunn, en 1970, a observé l'action de l'halothane *in vitro* sur des cultures de lymphocytes à 37° C et après exposition à 2 % d'halothane dans une chambre d'observation. Il note sur 100 lymphocytes ayant une vitesse moyenne de 3,7 microns/minute, après une heure d'exposition, une décroissance de la vitesse de 0,6 microns/minute ( $P$  inférieur à 0,001). Après arrêt de l'halothane, des cellules retrouvent immédiatement leur vitesse de départ, alors que les autres sont immobiles, dans une proportion non précisée.

En 1968, Allison et Nunn ont retrouvé un effet des anesthésiques généraux dans les microtubules, en les dépolymérisant : les 6 S devenant des 3 S dont le poids moléculaire est de l'ordre de 60 000.

Plus tard, en 1970, Kitchung et Allison ont mis en évidence au microscope électronique la dépolymérisation des microtubules, lors de l'exposition de l'*Actinophaeerium nucleofilum* à des basses concentrations d'halothane.

Hirsch et Fedorko, en 1968, ont en effet retrouvé des petits microtubules de 150 Å de diamètre dans les lymphocytes humains. Il est possible qu'il existe une sensibilité de ces microtubules aux anesthésiques volatils halogénés.

Dans l'ensemble, ces auteurs ont retrouvé une dépolymérisation des microtubules ou des microfilaments lors d'une exposition prolongée aux anesthésiques généraux, et en particulier à l'halothane.

Dans le cas de cette étude, l'action initiale, directe de dépression de la mobilité in vitro des leucocytes neutrophiles à des concentrations anesthésiques d'halothane n'est pas liée à une telle action puisque des photos de microscopie électronique (Photos 1, 2, 3) ne montrent pas à 5, 15 et 30 minutes d'exposition à l'halothane 4 % de dépolymérisation des microtubules. Les microtubules et les centrioles semblent normaux.

#### 7. DERNIÈRE CONSTATATION RESSORTANT DE NOTRE SÉRIE D'EXPÉRIENCES :

L'oxygène, la présence d'hématies, l'AMP 3'5' cyclique, dibutirylé ou non, à la concentration de  $5 \cdot 10^{-3}$  Molaire, et aussi le protoxyde d'azote (Fig. 55) empêchent la dépression initiale provoquée à 5 minutes, par l'halothane en phase gazeuse, et in vitro.

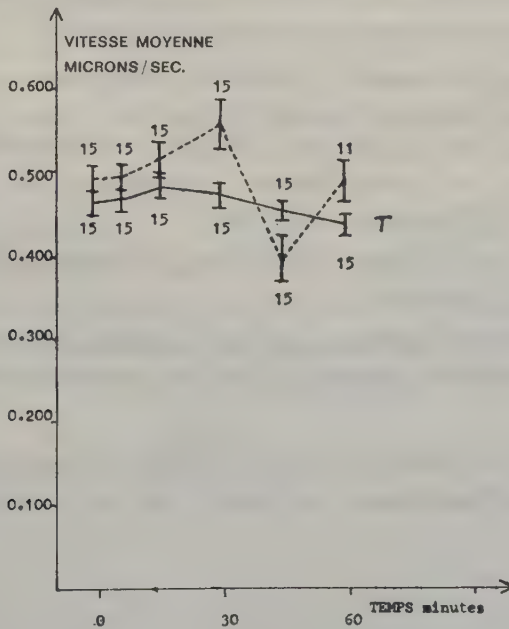


Fig. 55. — Interaction de l'halothane 4 % et du protoxyde d'azote 75 % dans une ambiance gazeuse oxygénée (carbogène)

a) *La présence d'hématies* est fondamentale, puisque la dépression initiale est fonction de leur concentration dans le milieu, comme nous l'avons vu. Cette inhibition peut être liée à deux propriétés :

— le fait que les hématies transportent de l'halothane, et donc qu'en présence d'hématies, l'halothane étant en partie transporté par ces dernières, le nombre de molécules d'halothane au niveau des polynucléaires (membranaires, ou intracytoplasmiques) est inférieur ;

— le fait que les hématies transportent de l'oxygène, qui peut agir par compétition directe avec l'halothane au niveau des polynucléaires. Les cellules blanches peuvent aussi être plus réceptives à l'action de l'halothane, lorsqu'elles sont moins oxygénées.

Les deux courbes de l'action de l'halothane à 4 %, en présence de sang complet et en atmosphère oxygénée ne sont pas superposables. Il existe en effet une dépression retardée, mais certaine, dans le cas de l'exposition au carbogène, alors qu'il n'y a pas de dépression du tout sur sang complet. Dans ce dernier cas, les deux mécanismes doivent être présents.

b) *L'oxygène* retarde en effet la dépression de la motilité, qui est aussi d'ailleurs moins importante. Deux possibilités : inhibition directe sur des sites identiques ou différents au niveau membranaire ou intracellulaire, épuisement plus rapide dans un milieu insuffisamment oxygéné.

Contre cette dernière hypothèse, la réversion spontanée au bout de 5 à 15 minutes.

c) *L'AMP 3'5' cyclique* agit de la même manière au niveau cellulaire, peut-être parce qu'il est une source d'énergie intracellulaire.

d) *Enfin le protoxyde d'azote* inhibe lui aussi la dépression cellulaire de l'halothane ; on ne sait par quel mécanisme.

## CONCLUSION

Plusieurs aspects ont été mis en évidence dans cette étude expérimentale :

In vitro, l'observation des polymorphonucléaires neutrophiles ne peut être effectuée que dans des conditions constantes de pH et de température, du fait de l'importance de l'action et de l'interaction de ces deux facteurs sur la mobilité leucocytaire.

C'est dire l'importance d'un système de mise en température des préparations, fiable et maintenant une température constante du début à la fin des expériences.

Les leucocytes sont plus viables lorsque le sang est prélevé sous calciparine, plutôt que sous un autre anticoagulant.

Le calcium est indispensable à la mobilité leucocytaire, in vitro.

L'action des gaz anesthésiques est variable, dans l'ensemble dépressive :

— l'éther, le chloroforme, le protoxyde d'azote ont une action toxique, directe dans des conditions peu physiologiques ;

— les gaz halogénés (méthoxyflurane et halothane) ont une action singulière : dépression initiale de 5 à 15 minutes, selon la concentration, spontanément réversible, reproductible dans le temps, ne correspondant pas à une modification de la viscosité du milieu.

Il n'y a pas d'hyperexcitabilité cellulaire, sauf à 20 minutes et en présence de 4 % d'halothane.

Les courbes dose-réponse, en ce qui concerne la dépression à 5 minutes, pour ces deux gaz, sont des exponentielles, d'ouvertures différentes. Ceci serait en faveur d'une accumulation de l'halothane au niveau cellulaire ou membranaire, qui ne pourrait agir qu'à partir d'une certaine concentration moléculaire :

— cette dépression initiale, dans le cas de l'halothane à 4 % est inhibée par : l'oxygène, les hématies, l'AMP 3'5' cyclique dibutyrylé ou non, et le protoxyde d'azote ;

— elle ne correspond pas au niveau cellulaire à la dépolymérisation des microtubules ou des microfilaments, comme c'est décrit sur ces cellules, après une exposition prolongée aux anesthésiques généraux et en particulier à l'halothane. Nos photographies de microscope électronique, faites dans ces conditions expérimentales, sont normales à 5, 15 minutes.

Dans l'ensemble, il serait intéressant d'intégrer ce test d'étude directe de la motilité leucocytaire aux tests d'immunité cellulaire classiques.

Des expériences couplées sont faites actuellement dans ce sens, avec des drogues connues, spécifiques ou non.

Vu et permis d'imprimer :

|                         |                                      |
|-------------------------|--------------------------------------|
| Le Président de Thèse : | Le Doyen de la Faculté de Médecine : |
| G. VOURC'H              | J. BAUMANN                           |

Le Recteur de l'Académie de Paris :  
MALLET

## BIBLIOGRAPHIE

*Ce travail a fait l'objet des publications suivantes :*

- NAHAS G.G., TANNIÈRES M.L., GOMBAUD-SAINTONGE G. et LENNON J.F.  
— Système pour l'étude des cellules du sang sous microscope.  
*Compte Rendu de la Soc. de Biolog.*, T. 165, n° 3, 544-46, 1971.
- TANNIÈRES M.L. et NAHAS G.G. — Quelques facteurs influençant le chimiotactisme des granulocytes. C.R. du Congrès d'Hématologie, Munich, 1970.
- TANNIÈRES M.L., LENNON J.F. et NAHAS G.G. — Interaction du pH et de la température sur la vitesse de locomotion leucocytaire. *J. de Physiologie*, T. 62, Suppl. 3, 454, 1970.
- TANNIÈRES M.L. et NAHAS G.G. — Interaction du pH et de la température sur la reptation leucocytaire. *C.R. de la Soc. de Biol.*, T. 164, n° 10, p. 1963-66, 1970.
- NAHAS G.G., TANNIÈRES M.L. et LENNON J.F. — Effects of pH and temperature. Direct measurement of leucocyte motility. *Soc. for Exp. Biol. and Med.*, T. 138, n° 1, 350-52, 1971.
- TANNIÈRES M.L., GOMBAUD-SAINTONGE G., LENNON J.F. et NAHAS G.G. — Effets de deux anesthésiques halogènes sur la vitesse de reptation leucocytaire. *J. de Physiol.*, T. 63, n° 6, 292-93, 1971.
- TANNIÈRES M.L., GOMBAUD-SAINTONGE G. et NAHAS G.G. — Divers anesthésiques et mobilité leucocytaire. *J. de Physiol.*, T. 64, 1972.
- TANNIÈRES M.L., GOMBAUD-SAINTONGE G. et NAHAS G.G. — Anesthésie du leucocyte. *Anesthésie-Analgésie-Réanimation*, T. 24, n° 4, 509-18, 1972.

### ACTION DES FACTEURS PHYSIQUES SUR LA MOBILITÉ LEUCOCYTAIRE

- ALLEN R.D. — A new theory of amoeboid movement and cytoplasmic streaming. *Exp. Cell. Res.*, suppl. : 8, 17, 1961.
- ALLISON A. et NUNN J.F. — Effects of general anesthetics on microtubules. A possible mechanism of anesthesia. *Lancet* : ii, 1326, 21 Dec. 1968.

- BARAT N. et DE BOISFLEURY A. — Etude de différents paramètres intervenant dans le nérotactisme des granulocytes après destruction par faisceau laser. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.* : 10, 739, 1970.
- BESSIS M. — Cellules du sang normales et pathologiques. Masson et Cie, 1972.
- BESSIS M. et BRETON-GORIUS J. — Sur une structure inframicroscopique péricentriolaire. Etude au microscope électronique sur les leucocytes des mammifères. *C.R. Acad. Sci.* : 225, 1010, 1958.
- BESSIS M., GIRES G. et NOMARSKI G. — Interaction des organelles cellulaires à l'aide d'un laser à rubis. *R.C. Acad. Sci.* : 246, 1289, 1962.
- BESSIS M. et BURTE B. — Chimiotactisme après destruction d'une cellule par microfaisceau laser. *C.R. Soc. Biol.* : 158, 1995, 1964.
- BESSIS M. et BURTE B. — Positive and negative chemotaxis as observed after destruction of a cell by U.V. or laser microbeams. *Texas Reports Biol. and Med.* : 23, 204, 1965.
- BESSIS M. et STORB R. — Sensibilité des leucocytes au laser à rubis après différentes colorations vitales. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.* : 5, 459, 1965.
- BOREL C.L., FREI J., HORVATH G., MONTRI S. et VANNOTI A. — Etude comparée du métabolisme du polynucléaire et de la cellule mononucléée chez l'homme. *Helvetica Med. Acta* : 5, 785, 1959.
- BOURNE H.R., LEHRER R.I., CLINE M. et MELMON K.L. — Cyclic 3'5' Adenosine monophosphate in human leucocyte. Synthesis. Degradation. Effects on neutrophil Candidacidal activity. *J. of Clin. Invest.* : 50, 920, 1971.
- BOVEE E.C. — A possible explanation of the « gel-sol » changes in amoeboid movement based on the muscle contraction theories of Szent-Gyorgy. *Proc. Iawa. Acad. Sci.* : 59, 428, 1952.
- BOYDEN S. — The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J. Exp. Med.* : 115, 453, 1962.
- BRYANT R.E., DESPRES R.M., VANWAY M.H. et ROGERS D.E. — Studies on human leukocyte motility : 1 - Effects of alterations in pH, electrolyte concentration, and phagocytosis on leukocyte migration, adhesiveness and aggregation. *J. Exp. Med.* : 124, 483, 1966.
- COMMANDON J. — Action de la température sur la vitesse de reptation des leucocytes. *C.R. Soc. Biol.* : 82, 1305, 1914.
- COMMANDON J. — Action de la température sur la reptation leucocytaire. *R.C. Soc. Biol.* : 102, 1919, 1919.
- Mac CUTCHEON M. — Studies of locomotion of leucocytes : I - The normal rate of locomotion of human neutrophilic leucocytes in vitro. *Amer. J. Physiol.* : 66, 180, 1923.

- Mac CUTCHEON M. — Studies of locomotion of leucocytes : II - The effect of temperature on the rate of locomotion of humans neutrophilic leucocytes in vitro. *Amer J. Physiol.* : 66, 185, 1923.
- FENN W.O. — The temperature coefficient of phagocytosis. *J. Gen. Physiol.* : IV, 331, 1922.
- FEO C. et BRETON-GORIUS J. — Action comparée d'un dérivé de la colchicine et de la podophylline sur le blocage des mitoses et la disparition des microtubules. *Nouv. Rev. Fr. Hématol.* : 8, n° 6, 827, 1968.
- FREED J.J., BHISEY A.N. et LEBOWITZ M.M. — The relation of microtubules and microfilaments to the motility of cultured cells. *J. Cell. Biol.* : 39, 46 a, 1968.
- GAMOW R.I., BOOTGER B. et BARNES F. — Analysis of chemotaxis in the blood cells. *Biophysical J.* : 11, 860, 1962.
- GRAF D. et KEYSERLING K. — Elektronenmikroskopische untersuchung über die differenzierungsvorgänge im cytoplasma von segmentierten neutrophilen leukozyten während zellbewegung. *Z. Zellforsch* : 45, 378, 1956.
- DE HARVEN BERNHARD. — Etude au microscope électronique de l'ultrastructure du centriole chez les vertébrés. *Exp. Cell. Res.* : 51, 79, 1968.
- HIRSCH J.G. et CHURCH A.B. — Studies of phagocytosis of group A streptococci by PMN in vitro. *J. Exp. Med.* : 111, 309, 1960.
- HOUSSAY. — Quelques précisions apportées à l'étude du nécrotactisme. Thèse 1968.
- HURLEY J.V. — Incubation of serum with tissu extraction as a cause of chemotaxis of granulocytes. *Nature* : 198, 1212, 1963.
- JAHN T. et BOVEE E.G. — Protoplasmic movements within cells. *Physiological Reviews* : 49, 793, 1969.
- JOLLY. — Etude de la reptation leucocytaire. *C.R. Soc. Biol.* : 74, 504, 1913.
- KELLER H.E. et SORKIN E. — Studies of chemotaxis : I - On the chemotactic and complement - fixing activity of gammaglobulins. *Immunology* : 9, 241, 1965.
- KELLER H.E. et SORKIN E. — Studies of chemotaxis : II - The significance of normal sera for chemotaxis induced by various agents. *Immunology* : 9, 441, 1965.
- KELLER E.F. et SEGEL L.A. — Model for chemotaxis. *J. of theoretical Biol.* : 30, 2, 225, 1971.
- KELMAN G.R. et NUNN J.F. — Normograms for correction of blood  $pO_2$ ,  $pCO_2$ , pH and base excess for time and temperature. *J. Appl. Physiol.* : 21, 1484, 1966.
- LAPIN J. et HONORICK A. — Amoeboid motility of human leukocytes. *Blood* : 11, 225, 1956.
- LEAHY D.R., Mc LEAN E.R. et BONNER J.T. — Evidence for cyclic 3'5' Adenosine monophosphate as chemotactic agent for polymorphonuclear neutrophil leucocytes. *Blood* : 36, 1, 52, 1970.

- LENNON J.F. présenté par NAHAS G.G. — Mesure et contrôle de la température des préparations sous microscope. *C.R. Soc. Biol.* : 164, 1963, 1970.
- LUN HU C. et BARNES F.S. — A theory of necrotaxis. *Biophysical J.* : 3.2.70.
- MAST S.O. — Structure, movement, locomotion and stimulation in Amoeba. *J. Morphol.* : 41, 347, 1926.
- MOMMAERTS W.F.H.M. et GREEN I. — Adenosin triphosphate systems of muscle : III - A survey of the adenosine triphosphate activity of myosin. *B. Biol. Chem.* : 208, 833, 1954.
- PHELDS P. et STANISLAW D. — Polymorphonuclear leucocyte motility in vitro : effect of pH, temperature, ethylalcohol, and caffeine, using a modified Boyden chamber technic. *Arthritis and Rheumatism J.* : 12, 3, 181, June 1969.
- PITTS R.F. et MAST S.O. — The relation between inorganic salt concentration, hydrogen ion concentration and physiological processes in Amoeba proteus : I - Rate of locomotion, gel-sol ratio, and hydrogen ion concentration in balanced salt solutions. *J. Cell. Comp. Physiol.* : 3, 449, 1934.
- PITTS R.F. et MAST S.O. — II - Rate of locomotion, gel-sol ratio and hydrogen concentration in solutions of single salts. *J. Cell. Comp. Physiol.* : 4, 435, 1934.
- PITTS R.F. et MAST S.O. — III - The interaction between salts antagonism in relation to hydrogen ion concentration and salts concentrations. *J. Cell. Comp. Physiol.* : 4, 435, 1934.
- POLICARD A. et BESSIS M. — Essai de classification des expansions cytoplasmiques observées dans les cellules vivantes. *Rev. Hématol.* : 7, 543, 1952.
- RENALDI R. et BAKER W.R. — A sliding filament model of amoeboid motility. *J. Theoretical Biol.* : 23, 463, 1969.
- ROSENTHAL J.B. — L'effet de la température sur le pH du sang et du plasma in vitro. *J. Biol. Chem.* : 137, 25, 1948.
- TULLIS J.L. — Preservation of leucocytes. *Blood* : 8, 563, 1953.
- WARD P.A. — Chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. *Immunology* : 99, *Biochemical Pharmacol* : suppl. Mar. 1968.

ACTION DES GAZ ANESTHÉSQUES SUR LA MOBILITÉ  
DES POLYNUCLÉAIRES NEUTROPHILES IN VITRO

- ALLISON A.C. et NUNN J.F. — Effect of general anesthetics on microtubules. A possible mechanism of anesthesia. *Lancet* : ii, 1326, 21 Dec. 1968.
- ANDERSEN N.B. — Anesthetics and cell division. *J. of Anesthesiology* : 30, n° 4, 361, 1969.
- ARONSON H.B., LAASBERG H., CHARCH S. et ETSTEN B. — Influence of anesthetic agents upon plasma electrophoretic motility and surface tension as related to blood viscosity. *Anesthesia and Analgesia current researches* : 46, 5, 642, 1967.

- BARRY P.P., PAIEMENT B. et DUBEAU M. — Recherches sur l'activité antibactérienne de certains agents anesthésiques. *Can. Anaest. Soc. J.* : 11, 6, 640, 1964.
- BRUCE D.L. — Effect of halothane anesthesia on extravascular mobilisation of neutrophils. *J. Cell. Physiol.* : 68, 81, 1966.
- BRUCE D.L. — Effect of halothane anesthesia on experimental Salmonella peritonitis in mice. *J. Surg. Res.* : 7, 180, 1967.
- BRUCE D.L. — Normal thymidine entry into halothane treated lymphocytes. *Anesthesiology* : 37, 6, 588, 1972.
- BRUCE D.L. et WINGARD D.W. — The effect of anesthesia on transplant rejection. *Anesthesiology* : 30, 235, 1969.
- BRUCE D.L. et TAURIG H.H. — The effect of halothane on the cell cycle in rat small intestine. *Anesthesiology* : 30, 4, 401, 1969.
- BRUCE D.L. et WINGARD D.W. — Anesthesia and immune response. *Anesthesiology* : 34, 3, 271, 1971.
- EGER E. et SHARGEL R. — The solubility of Methoxyflurane in human blood and tissues homogenates. *Anesthesiology* : 24, 5, 625, 1963.
- FAGRAENS A. — Antibody production in relation of the development of plasma cells in vivo and in vitro experiments. *Acta Med. Scand.* : 130, suppl. 204, 7, 1948.
- GREEN C.D., EASTWOOD D.W. — Effect of nitrous oxide inhalation on hematopoiesis in rats. *Anesthesiology* : 24, 341, 1963.
- HENRY M.C., EHRLICH R. et BLAIR W.H. — Effect of nitrogen dioxide on resistance of Squirrel monkeys to Klebsiella pneumoniae infection. *Arch. Environmental Health* : 18, 4, 580, April 1969.
- HIRSCH J.G. et FEDORKO M.E. — Microtubules of human lymphocytes. *J. Cell. Biol.* : 38, 615, 1968.
- HUMPHREY L.J., WINGARD D.W. et LANG R. — Effect of halothane on spleen cells. In vitro studies of reversibility of immunosuppression. *Surgery* : 65, 939, 1969.
- HUMPHREY L.J., WINGARD D.W., LANG R. — The effect of surgery and anesthesiology on the immunologic responsiveness in the rat. *Surgery* : 65, 946, 1969.
- HUMPHREY L.J., AMERSON J.R. et FREDERIKSON E.L. — Preliminary observations on the effect of halothane and oxygen anesthesia on the immunologic response in man. *Anesth. Analges.* : 49, 809, 1970.
- KITCHUNG, ALLISON. — Non publiés (confer NUNN, SHARP et KIMBALL).
- LANSEN H.G., HENRIKSEN E., NEUKIRCH F. et KRISTENSEN H.S. — Treatment of tetanus : Severe bone marrow depression after prolonged nitrous oxide anesthesia. *Lancet* : i, 526, 1956.
- LOWENBURG H. — Studies on the effect of narcosis on the rate of locomotion of polymorphonuclear leucocytes in vitro. *Amer. J. Med. Sci.* : 188, 472, 1934.
- NUNN J.F., SHARP J.A. et KIMBALL K.L. — Reversible effect of an inhalational anesthetic on lymphocyte motility. *Nature* : 226, 85, 4 April 1970.

- RADIGUET DE LA BASTAIE P., PICARD P., GOURVES J. et POUJOL C. —  
Les évaporateurs à halothane. *Anesth. Analg. Réa.* : 25, 3,  
243, 1968.
- VALAND S.B., ACTON J.D., MYRVICK Q.N. et WISTON-SALE M. —  
Nitrogen dioxide. Inhibition of viral induced resistance in  
alveola monocytes. *Arch. Environmental Health* : 20, 3, 303,  
1970.

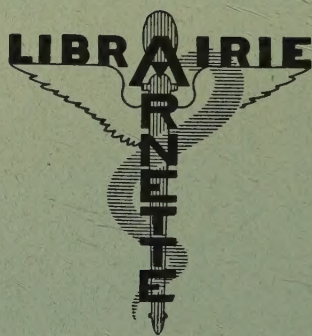
## TABLE DES MATIERES

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <i>Introduction. Définition de la mobilité leucocytaire</i> .....                                                                                | 15  |
| I. — Description du phénomène observé au microscope<br>optique (contraste de phase). Comparaison en<br>électronique .....                        | 16  |
| II. — Interprétation .....                                                                                                                       | 17  |
| III. — Orientation de la mobilité leucocytaire dans un<br>milieu pluricellulaire. Différence entre mobilité<br>spontanée et chimiotactisme ..... | 22  |
| IV. — Mobilité des autres cellules de la lignée blanche<br>in vitro .....                                                                        | 23  |
| <i>Techniques d'étude de la mobilité leucocytaire des PMN</i> ....                                                                               | 24  |
| I. — Historique .....                                                                                                                            | 24  |
| II. — Description de la méthode .....                                                                                                            | 26  |
| <i>Action des facteurs physiques</i> .....                                                                                                       | 38  |
| I. — Définition d'une vitesse moyenne. Viabilité in<br>vitro. Définition d'une vitesse témoin. Diagramme<br>des vitesses au temps O .....        | 39  |
| II. — Action des facteurs physiques .....                                                                                                        | 43  |
| <i>Résultats</i> .....                                                                                                                           | 59  |
| I. — Action de diverses ambiances gazeuses sur la<br>motilité leucocytaire .....                                                                 | 60  |
| II. — Etude de l'action des gaz anesthésiques sur la<br>motilité des PMN .....                                                                   | 62  |
| <i>Conclusion</i> .....                                                                                                                          | 99  |
| <i>Bibliographie</i> .....                                                                                                                       | 101 |

TABLE DES MATIÈRES

|     |                                                        |
|-----|--------------------------------------------------------|
| 17  | Introduction. Définition de la mobilité laryngée       |
| 18  | I. — Description du phénomène observé au laryscope     |
| 19  | II. — Définition de la mobilité laryngée               |
| 20  | III. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 21  | IV. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 22  | V. — Définition de la mobilité laryngée dans les       |
| 23  | VI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 24  | VII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 25  | VIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 26  | IX. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 27  | X. — Définition de la mobilité laryngée dans les       |
| 28  | XI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 29  | XII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 30  | XIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 31  | XIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 32  | XV. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 33  | XVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 34  | XVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 35  | XVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 36  | XIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 37  | XX. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 38  | XXI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 39  | XXII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 40  | XXIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 41  | XXIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 42  | XXV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 43  | XXVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 44  | XXVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 45  | XXVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les  |
| 46  | XXIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 47  | XXX. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 48  | XXXI. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 49  | XXXII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 50  | XXXIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les  |
| 51  | XXXIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 52  | XXXV. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 53  | XXXVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 54  | XXXVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les  |
| 55  | XXXVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les |
| 56  | XXXIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 57  | XL. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 58  | XLI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 59  | XLII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 60  | XLIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 61  | XLIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 62  | XLV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 63  | XLVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 64  | XLVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 65  | XLVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les  |
| 66  | XLIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 67  | L. — Définition de la mobilité laryngée dans les       |
| 68  | LI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 69  | LII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 70  | LIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 71  | LIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 72  | LV. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 73  | LVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 74  | LVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 75  | LVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 76  | LIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 77  | XL. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 78  | LI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 79  | LII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 80  | LIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 81  | LIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 82  | LV. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 83  | LVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 84  | LVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 85  | LVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 86  | LIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 87  | XL. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 88  | LI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 89  | LII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 90  | LIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 91  | LIV. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 92  | LV. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 93  | LVI. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 94  | LVII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |
| 95  | LVIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les   |
| 96  | LIX. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 97  | XL. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 98  | LI. — Définition de la mobilité laryngée dans les      |
| 99  | LII. — Définition de la mobilité laryngée dans les     |
| 100 | LIII. — Définition de la mobilité laryngée dans les    |





ISBN - 2-7184-0139-7